

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Vasoconstricción adrenérgica en arterias cerebrales aisladas
de cabra**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Victoria Conde Ederra

Madrid, 2015

M^a Victoria Conde Ederra

TP
1980
021



* 5 3 0 9 8 5 2 7 0 X *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-03-223104-9

**VASOCONSTRICCIÓN ADRENERGICA EN ARTERIAS
CEREBRALES AISLADAS DE CABRA**

Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© M^a Victoria Conde Ederra
Editorial de la Universidad Complutense de Madrid
Servicio de Reprografía, Noviciado, 3-Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-5520-1980

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

VASOCONSTRICCIÓN ADRENERGICA EN ARTERIAS CEREBRALES

ASLADAS DE CABRA

RESUMEN DE LA TESIS

que para alcanzar el Grado de Doctor en Farmacia

presenta

M^a VICTORIA CONDE EDERRA

Madrid, 1979

El presente trabajo ha sido llevado a cabo con el objeto de poner de manifiesto la actividad funcional de terminaciones nerviosas simpáticas en arterias aisladas del polígono de Willis de cabras.

Después de sacrificado el animal se procedió a la extracción del cerebro, se disecaron cilindros vasculares, de 4 mm de longitud, de arteria cerebral media y arteria comunicante posterior que eran montadas de acuerdo con el método descrito por Nielsen y Owman (1971) para el registro isométrico de contracciones.

Para realizar la estimulación eléctrica de campo se conectaron a un estimulador dos electrodos de platino situados a ambos lados del segmento arterial. Se emplearon trenes de 300 impulsos, a voltaje supramáximo, de 0.5 mseg de duración y frecuencia de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 Hz; las curvas frecuencia-respuesta fueron de tipo acumulativo.

Se realizaron experimentos de estimulación eléctrica en segmentos arteriales procedentes de animales que tenían agotado el contenido de catecolaminas de las vesículas sinápticas por acción de reserpina, o bien se les había producido degeneración de las terminales nerviosas perivasculares mediante extirpación de ambos ganglios simpáticos cervicales superiores.

Cuando se estimularon eléctricamente segmentos arteriales en presencia de fármacos, estos se añadieron al baño de órganos 10 minutos antes de comenzar el experimento y estuvieron en contacto con el tejido vascular durante la realización de la curva de estimulación.

Se efectuaron curvas dosis-efecto para tiramina en dosis acumuladas. Fue empleada en estado de sal y expresado como concentración molar final en el baño de órganos.

La noradrenalina presente en las terminaciones nerviosas perivasculares pertenecientes al polígono de Willis se determinó espectrofluorométricamente mediante el método de la

formación del fluoróforo trihidroxi-indol según la técnica de Shellenberger y col. (1972).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1. La estimulación eléctrica del segmento arterial aislado provoca un incremento de tensión dependiente de la frecuencia.

2. La respuesta contráctil se bloquea al añadir tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6} M$), fármaco que impide la transmisión del impulso nervioso.

3. Tanto la reserpinización como la denervación y el bretilio ($5 \cdot 10^{-5} M$) disminuyen significativamente la respuesta al estímulo eléctrico.

4. En cilindros arteriales procedentes de animales denervados hay una contracción como respuesta al estímulo eléctrico que no desaparece en presencia de tetrodotoxina o de fentolamina en ninguna de las frecuencias empleadas.

5. La estimulación eléctrica produce la liberación del neurotransmisor que, a su vez, activa los receptores alfa adrenérgicos, ya que en presencia de fentolamina ($10^{-6} M$) aparece reducida significativamente la respuesta contráctil.

6. La adición de cocaína ($10^{-6} M$) no modifica la contracción inducida por el estímulo eléctrico en ninguna de las frecuencias empleadas.

7. Concentraciones crecientes de tiramina producen un incremento de tensión dependiente de la dosis. Segmentos arteriales procedentes de animales denervados, muestran una disminución de su capacidad contráctil estadísticamente significativa.

8. La medida fluorométrica de noradrenalina en vasos cerebrales del polígono de Willis de cabra, da un contenido de $2.10 \mu g$ de noradrenalina por gramo de tejido, que es indetectable en arterias procedentes de animales reserpinizados o gangliectomizados.

SALVADOR LLUCH, Catedrático de Fisiología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Au-
tónoma de Madrid,

CERTIFICO que M^a VICTORIA CONDE EDERRA ha reali-
zado bajo mi dirección, el presente trabajo:
"VASOCONSTRICCIÓN ADRENERGICA EN ARTERIAS
CEREBRALES AISLADAS DE CABRA" como Tesis pa-
ra alcanzar el Grado de Doctor en Farmacia.

Madrid, 25 de abril de 1979

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Lluich', written in a cursive style.

Fdo. S. Lluich

Este trabajo ha sido subyencionado en parte por el Instituto Nacional de Previsión y por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia de Gobierno.

Quiero manifestar mi agradecimiento:

A los Drs. Bernardino Gómez y Salvador Lluch, directores de esta Tesis, a quienes agradezco su amistad y su dedicación.

A los Drs. Jesús Marín y Mercedes Salas por su colaboración en la realización de los experimentos.

A la Srta. M^a Esther Martínez por su colaboración en la confección mecanográfica del trabajo.

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología que me ayudaron de diversas maneras.

Al Dr. Cadórniga, Catedrático de Farmacia Galénica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid le agradezco su amabilidad al aceptar ser ponente de esta Tesis.

A D. Bautista García y a D. Agapito García por su inapreciable labor en el cuidado de los animales.

INDICE

1.- Introducción	1
2.- Objetivos	12
3.- Material y Métodos	14
4.- Resultados	24
I. Estimulación eléctrica de campo de las arterias cerebral media y comunicante posterior	24
II. Respuesta obtenida por dosis crecientes de tiramina en arteria cerebral media aislada	48
III. Cantidad de noradrenalina medida por fluorometría en arterias cerebrales de cabra	51
5.- Discusión	53
6.- Resumen	67
7.- Conclusiones	69
8.- Bibliografía	70

INTRODUCCION

Desde que Willis describió en 1664 fibras nerviosas en arterias cerebrales de la pia del hombre (Willis, 1664), la presencia de terminaciones nerviosas en vasos sanguíneos cerebrales de diversas especies animales, incluido el hombre, ha sido ampliamente confirmada.

Chorobski y Penfield, en 1932, describieron fibras parasimpáticas procedentes del nervio facial en vasos de la pia de monos que pasando por el ganglio geniculado continúan por el nervio petroso superficial mayor hacia el plexo de la arteria carótida interna donde hacen sinapsis; la estimulación eléctrica de esta vía producía dilatación de dichos vasos. Asimismo con técnicas de microscopio electrónico Nelson y Rennels (1970) y Nielsen y col., (1971), ponen de manifiesto la presencia de fibras colinérgicas en arterias cerebrales de la pia de ratas y gatos. Iguales resultados obtienen con la técnica de la colinesterasa Edvinsson y col., (1972), Edvinsson y col., (1976) en arterias cerebrales de la pia de diversos animales de laboratorio (ratas, conejos, hamsters y gatos) así como de fetos y tumores cerebrales humanos. Mientras que el origen de la inervación adrenérgica de los vasos cerebrales se encuentra en el ganglio cervical superior, para los ner-

vios colinérgicos todavía es desconocido (Edvinsson y Mac Kenzie, 1977). Posiblemente el ganglio se encuentre cercano al sistema efector, ya que han sido identificadas formaciones ganglionares colinérgicas en la adventicia de la parte craneal de la arteria carótida interna y en el seno carotídeo.

La existencia de inervación simpática en los vasos cerebrales ha sido confirmada por estudios morfológicos realizados con microscopio óptico revisados por Roseblum (1965) y Millar (1969), con técnicas de microscopia de fluorescencia (Nielsen y col., 1967; Hernández-Pérez y Stone, 1974; Edvinsson y col., 1976), con microscopio electrónico (Nelson y Rennels, 1970; Nielsen y Owman, 1971; Dahl, 1973) y métodos bioquímicos para determinaciones del contenido de noradrenalina (Owman y col., 1974; Urquilla y col., 1974).

Mediante un micrómetro ocular acoplado a una ventana craneal, Forbes y Wolff (1928) observaron en gatos anestesiados que el estímulo eléctrico del nervio simpático cervical provocaba vasoconstricción de las arterias cerebrales de la pia, mientras que la estimulación del cabo central del nervio vago seccionado producía dilatación de las mismas; por aplicación local, intravenosa o en arteria carótida de adrenalina obser-

varon disminución del calibre arterial. Estos resultados les hicieron pensar que la circulación cerebral de mamíferos es controlada, en parte, por nervios vasomotores.

Aplicando métodos de histofluorescencia se ha demostrado, en diversas especies animales y en el hombre, la inervación simpática de diferentes partes del sistema vascular cerebral: las principales arterias de la base del cerebro, sistema arterial y venoso de la pia, y parte del sistema vascular intracerebral (Nielsen y Owman, 1967; Peerless y Yasargil, 1971; Sercombe y col., 1975; Edvinsson y col., 1976; Edvinsson y MacKenzie, 1977). Las terminaciones nerviosas están situadas generalmente en la adventicia, adyacentes a la capa muscular de la media. En arterias cerebrales de gatos normales aparece fluorescencia verdosa, es decir, producida por catecolaminas, asociadas a fibras nerviosas que desaparece a las 4 horas de haber administrado al animal 5 mg de reserpina por vía intraperitoneal; la simpatectomía cervical superior (Nielsen y Owman, 1967) también produce al cabo de una semana la desaparición de la fluorescencia, demostrando con esto que las fibras adrenérgicas que inervan las arterias cerebrales del polígono de Willis tienen su origen en el ganglio

simpático cervical superior. Por otra parte, la organización de la inervación simpática en estos vasos cerebrales es semejante a la encontrada en otras partes de la circulación. Resultados análogos han sido encontrados en monos, ratas, conejos y en el hombre (Iwayama y col., 1970; Hernández-Pérez y Stone, 1974; Lee y col., 1976; Edvinsson y col., 1976; Kuschinsky y Wahl, 1978).

Estos resultados han sido confirmados por métodos bioquímicos. En el sistema vascular de la pia de conejos, Edvinsson y col. (1972), han puesto de manifiesto la existencia de fibras nerviosas simpáticas conteniendo catecolaminas en la pared de arterias intracranéanas; por fluorometría detectan 1.50 µg noradrenalina por gramo de tejido que desaparece a las 48 horas de haber realizado la extirpación de ambos ganglios simpáticos cervicales superiores. En vasos cerebrales del polígono de Willis de cabras y por el mismo método fluorométrico, se detectan 2.10 µg de noradrenalina por gramo de tejido; si el contenido de catecolaminas ha sido agotado por administración i.v. previa de 0.02 mg de reserpina por kg de peso durante tres días, la cantidad de noradrenalina de las arterias cerebrales queda reducida a niveles indetectables, (Urquilla y col., 1974).

Experimentos realizados en primates y gatos anestesiados, han mostrado pequeños cambios en el flujo sanguíneo cerebral después de la denervación simpática de los vasos cerebrales (Deshmukh y col., 1971; Waltz y col., 1971; Fitch y col., 1975). Dichos resultados difieren de los encontrados por Edvinsson y col. (1973), al estudiar la influencia del sistema nervioso simpático sobre el lecho vascular intracraneal midiendo cambios en el volumen sanguíneo cerebral de ratones machos sin anestesiar. A las 24 horas de realizar la simpatectomía cervical superior encuentran aumento del volumen sanguíneo cerebral probablemente debido a la desaparición de noradrenalina presente en las terminaciones nerviosas en degeneración, que sería la responsable de la pérdida del tono vascular, es decir, de la vasodilatación encontrada. Progresivamente se van alcanzando los valores iniciales de volumen sanguíneo cerebral sugiriendo el restablecimiento del tono vacular debido al desarrollo de una supersensibilidad a las catecolaminas circulantes. Por extirpación del ganglio simpático cervical superior, se pone de manifiesto un marcado aumento del flujo sanguíneo cerebral en cabras despiertas (Alborch y col., 1977), que probablemente es debido a la pérdida de un tono adrenérgico existen-

te en los vasos cerebrales.

La presencia del neurotransmisor adrenérgico en los nervios que llegan a la musculatura lisa de las arterias cerebrales puede ponerse de manifiesto bien mediante el empleo de un fármaco simpatomimético de acción indirecta, como la tiramina (Trendelenburg, 1961), o al estimular eléctricamente la cadena simpática cervical por producir una despolarización semejante a la del impulso nervioso (Eccles, 1973).

La tiramina libera el neurotransmisor adrenérgico de los lugares de almacenamiento de la terminación axonal. Esta amina liberada es capaz de producir una respuesta en el órgano efector que será disminuida por acción de sustancias que antagonicen el efecto del neurotransmisor liberado (fentolamina), que disminuyan el contenido neuronal de noradrenalina (reserpina) o por degeneración de las fibras perivasculares al extirpar los ganglios simpáticos cervicales superiores.

Al administrar tiramina directamente en la circulación cerebral de la cabra despierta se pone de manifiesto una disminución del flujo sanguíneo cerebral dependiente de la dosis, que para la máxima empleada, 500 µg, es del 36% (Lluch y col., 1975). Tanto el tratamien-

to con reserpina como el bloqueo con fentolamina disminuyen la vasconstricción cerebral producida por tiramina. Esto indica que la disminución del flujo sanguíneo cerebral obtenida con tiramina es debida a la liberación de la amina endógena presente en las terminales nerviosas, estando implicados los receptores alfa adrenérgicos. Puesto que la administración local de tiramina no produce cambios en la presión arterial sistémica dicha vasoconstricción sería debida a una acción directa sobre la circulación cerebral más que a cambios hemodinámicos.

Por estímulo eléctrico de la cadena simpática cervical, Krog (1963) describe en aves disminución del flujo sanguíneo cerebral. En perros anestesiados, D'Alecy y Feigl (1972) obtienen una disminución del 64% del flujo sanguíneo cerebral al estimular eléctricamente el ganglio estrellado, apuntando hacia un posible mecanismo nervioso que regulara el flujo sanguíneo del cerebro. Con estos resultados están de acuerdo los obtenidos en cabras despiertas por estímulo eléctrico de la cadena simpática a nivel cervical (Lluch y col., 1975); la reducción del flujo sanguíneo cerebral encontrada es dependiente de la frecuencia de estimulación y no se influye por cambios en la presión arterial sistémica y en la frecuencia cardiaca. La administración directa en

la circulación cerebral de fentolamina elimina parcialmente la reducción del flujo sanguíneo cerebral inducida por el estímulo eléctrico; esto indica liberación de noradrenalina endógena de las terminales nerviosas perivasculares, la cual activa los receptores alfa adrenérgicos responsables de la vasoconstricción cerebral. Resultados semejantes obtienen Wahl y Kuschinsky (1977) en gatos; al estimular eléctricamente la cadena simpática cervical se produce contracción en arterias de la pia, siendo reducida esta contracción por aplicación de fentolamina en el espacio perivascular.

Existen dificultades para diferenciar los efectos directos de algunos fármacos sobre los vasos cerebrales de los efectos secundarios que resultan de los cambios en la frecuencia cardíaca, en la presión arterial sistémica y en el gasto cardíaco (Lluch y col., 1973). Una de las causas fundamentales que ha impedido el estudio de los mecanismos reguladores de la circulación cerebral es la multiplicidad de modelos experimentales en diversas especies animales. Por ello la utilización de vasos cerebrales aislados permite estudiar mecanismos más que alteraciones hemodinámicas, a pesar de que los estudios in vitro presenten la dificultad de extrapolar los resultados al animal entero o al hom-

bre. Aun así, la preparación de arterias aisladas tiene la ventaja de excluir los posibles factores hemodinámicos que podrían modificar el calibre de los vasos en el animal entero.

En experimentos realizados en segmentos aislados de arteria cerebral media de gato, la tiramina produce un efecto contráctil dependiente de la dosis administrada (Nielsen y col. 1971); si previamente se agota el contenido de noradrenalina de sus terminales nerviosas mediante el tratamiento del animal con reserpina, disminuye significativamente la respuesta a la tiramina. También desaparece la respuesta a la tiramina en segmentos arteriales procedentes de gatos a los que una semana antes se les ha extirpado el ganglio simpático cervical superior.

Resultados semejantes obtienen Urquilla y col., (1974) en arteria cerebral media aislada de cabra. Estos autores ponen de manifiesto que la tiramina libera noradrenalina endógena presente en la pared del vaso cerebral, dando lugar a un efecto vasoconstrictor que puede ser parcialmente eliminado por el tratamiento del animal con reserpina o por bloqueo adrenérgico al añadir fentolamina al baño de órganos. Estas observaciones indican que el efecto contráctil obtenido tiene lugar a través

de receptores alfa adrenérgicos.

La estimulación eléctrica de vasos cerebrales aislados se ha utilizado para poner de manifiesto la participación nerviosa en las variaciones de diámetro de estos vasos. Esta preparación permite conocer si la noradrenalina presente en los vasos cerebrales existe en cantidades suficientes para poder producir contracción vascular.

Hasta el momento actual los resultados que hay son conflictivos. Mientras que Toda y Fujita (1973), Cheng y Shibata (1978) no observan ninguna modificación en la tensión desarrollada al estimular eléctricamente arterias cerebrales aisladas de perro o de bovinos, Bevan y col. (1973), Marco y col. (1975), Muramatsu y col. (1978) ponen de manifiesto la capacidad contráctil de arterias o tiras aisladas de cerebros de conejo, gato o perro frente al estímulo eléctrico. Lee y col. (1976) afirma que aunque dicha contracción sea de tipo nervioso, puesto que se elimina por tratamiento con tetrodoxina, reserpinización o gangliectomía simpática cervical superior, el transmisor liberado podría ser otro distinto a la noradrenalina ya que la respuesta vasoconstrictora no disminuye en presencia de bloqueantes alfa adrenérgicos, beta adrenérgicos o fármacos que al-

teren el transporte de catecolaminas a través de la membrana.

En estudios recientes de Edvinsson y col. (1976), en arterias cerebrales humanas procedentes de la extirpación de tumores, la estimulación eléctrica de campo produce contracción vascular dependiente de la frecuencia y es inhibida por el bloqueante adrenérgico guanetidina.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue poner de manifiesto la actividad funcional de terminaciones nerviosas simpáticas en arterias cerebrales aisladas del polígono de Willis de cabra.

Para ello se estimularon eléctricamente segmentos arteriales de cabras en presencia de fármacos que confirmaran la naturaleza adrenérgica de la respuesta contráctil obtenida. La transmisión del potencial de acción a lo largo de la fibra nerviosa es impedida por la tetrodotoxina (Kao, 1966). La liberación del neurotransmisor desde la fibra nerviosa adrenérgica estará inhibida por acción del bretilio (Boura y Green, 1959). El efecto contráctil debido a la liberación de la noradrenalina endógena desde las terminaciones nerviosas perivasculares por acción del estímulo eléctrico estará disminuida en presencia de fentolamina, bloqueante de los receptores alfa adrenérgicos (Nickerson y Collier, 1975). Finalmente la recaptación de las aminas por la terminación nerviosa se verá afectada por la presencia de cocaína (Trendelenburg, 1959).

Por otro lado, se realizaron experimentos de estimulación eléctrica en segmentos arteriales procedentes de animales que tenían agotado el contenido de catecolaminas de las vesículas sinápticas por acción de re-

serpina (Nickerson y Collier, 1975) o bien se les había producido degeneración de las terminales nerviosas perivasculares mediante extirpación de ambos ganglios simpáticos cervicales superiores (Emmelin y Trendelenburg, 1972).

En otro grupo de arterias cerebrales obtenidas de animales control y gangliectomizados, se realizaron curvas dosis-efecto de tiramina (fármaco simpatomimético de acción indirecta, Trendelenburg, 1961).

Se midió la concentración de noradrenalina por fluorometría, en arterias cerebrales de animales control, animales tratados con reserpina y animales gangliectomizados.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización de los experimentos efectuados en el presente trabajo, se emplearon 35 cabras, con un peso comprendido entre 30 y 45 kg, procedentes del Parque de Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Procedimiento experimental

El animal fue sacrificado mediante inyección intravenosa de solución saturada de cloruro potásico y a continuación se procedió a la rápida y cuidadosa extracción del cerebro. Se disecaron las arterias cerebrales medias y comunicantes posteriores (Fig. 1), de las cuales se obtuvieron cilindros vasculares de 4mm de longitud y 500 μ m de diámetro exterior aproximadamente que eran montados de acuerdo con el método descrito más adelante para el registro isométrico de contracciones. El tiempo empleado desde la extracción del cerebro hasta el montaje de los cilindros vasculares en el baño de órganos era aproximadamente de 15 minutos.

Para registrar la contracción isométrica de los cilindros vasculares se empleó el método descrito por Nielsen y Owman (1971), que consiste en pasar dos alambres finos, de 150 μ m de diámetro, pero rígidos, de acero inoxidable a través de la luz del cilindro arterial; uno de

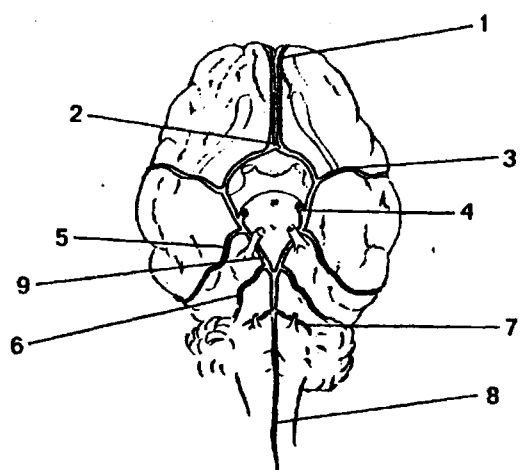


Figura 1.- Cerebro de cabra visto por su parte basal.
1- arteria cerebral anterior. 2- arteria comunicante anterior. 3- arteria cerebral media. 4- arteria carótida interna. 5- arteria cerebral posterior. 6- arteria cerebelosa anterior. 7- arteria cerebelosa posterior. 8- arteria basilar. 9- arteria comunicante posterior.

ellos va fijo a la pared del baño mientras que el otro se desplaza paralelamente al anterior. Este último va unido a un transductor de fuerza, "Universal Transducing Cell" UC3 y Statham Micro-Scale Accessory U15, que a su vez va conectado a un polígrafo Beckman Type RS Dynograph, en donde se registran los cambios de tensión, (Fig. 2). Inicialmente se aplicó al segmento arterial una tensión de reposo de 1 gramo que era ajustada cada 5 minutos durante un período de equilibrio de 60 a 90 minutos.

El baño de órganos donde se introducían los segmentos arteriales contenía 3 ml de solución Krebs-Henseleit burbujeada continuamente con una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de anhídrido carbónico (SEO) que le confería un pH de 7.3-7.4, y a una temperatura de 37°C. A su vez se disponía de un recipiente conteniendo un volumen de la solución anterior, mantenida en iguales condiciones de pH, temperatura y burbujeo de la mezcla gaseosa, y que era utilizada para cambios periódicos del baño. La composición de la solución de Krebs-Henseleit era:

NaCl	115 mM
KCl	4.6 mM
CaCl ₂	2.5 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
MgSO ₄ (7H ₂ O)	1.2 mM

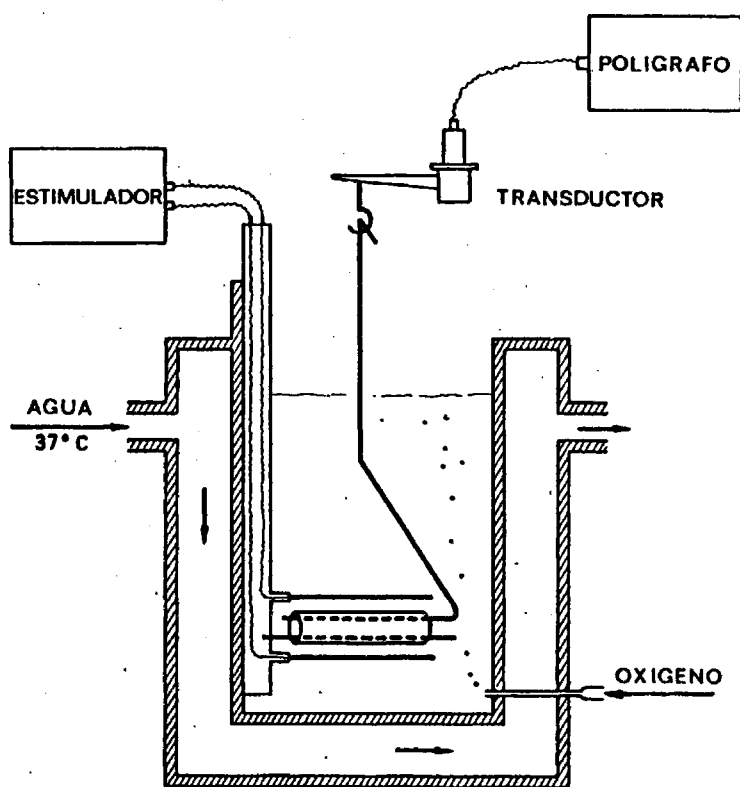


Figura 2.- Esquema de la preparación experimental para el estudio de la contracción isométrica de los segmentos vasculares.

NaHCO ₃	25	mM
glucosa	11.1	mM

Se adicionó EDTA con el fin de retrasar la oxidación de los compuestos derivados del grupo catecol (Urquilla y col., 1970).

Estimulación eléctrica de campo

Para la estimulación eléctrica se emplearon trenes de 300 impulsos, a voltaje supramáximo, de 0.5 mseg de duración y frecuencia de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 Hz, que fueron aplicados durante 5 min, 2 min 30 seg, 1 min 15 seg, 37 seg, 18 seg y 9 seg, respectivamente. Las curvas frecuencia-respuesta se efectuaron acumulativamente. Con cada segmento sólo se realizó una curva con el fin de evitar posibles alteraciones en el mecanismo contráctil producidos por la estimulación seriada. Para realizar la estimulación eléctrica de campo se conectaron a un estimulador Grass SD5 dos electrodos de platino situados a ambos lados del segmento arterial, (Fig.2).

Tratamiento con reserpina

Con el fin de vaciar las vesículas de los nervios simpáticos perivasculares de catecolaminas, se ad-

ministró por vía intravenosa 0.02 mg/kg/día de reserpina y al tercero de tratamiento se procedió a la extracción de las arterias cerebrales (Urquilla y col., 1974), comprobando previamente el grado de reserpinación de dichos animales por la aparición de temblor, diarrea, hipotensión arterial, bradicardia y alteración de sensorio.

Gangliectomia simpática cervical superior

La anestesia previa a la cirugía se llevó a cabo inyectando al animal una solución de tiopental sódico al 2% por vía intravenosa. Las intervenciones se hicieron en condiciones estériles, con el animal en ayunas, y con intubación traqueal y gástrica. La ventilación se mantuvo de forma artificial por medio de un respirador Harvard.

Para disecar el ganglio simpático cervical superior se practicó una incisión longitudinal retromandibular y lateral en el cuello, se resecó el asta mayor del hioides y se rebatió el vientre posterior del músculo digástrico, seguidamente se efectuó la extirpación del ganglio. A los 15 días de haber realizado esta intervención se procedió a la obtención de las arterias

del polígono de Willis.

Estimulación eléctrica en presencia de fármacos

Se estimularon eléctricamente cilindros arteriales procedentes del cerebro de animales control en presencia de tetrodotoxina $3 \cdot 10^{-6}$ M, bretilio $5 \cdot 10^{-5}$ M, fentolamina 10^{-6} M y cocaína 10^{-6} M.

Estos fármacos se añadieron 10 minutos antes de comenzar la estimulación eléctrica y estuvieron en contacto con el tejido vascular durante la realización de la curva de estimulación.

Curvas dosis-efecto de tiramina

Se efectuaron curvas dosis-efecto para tiramina en dosis acumuladas; en ningún caso el volumen final añadido excedía el 20% del volumen inicial del baño.

Las soluciones concentradas de los fármacos así como sus soluciones diluidas se hicieron en solución salina que contenía 0.01% de ácido ascórbico con el fin de evitar su oxidación. Antes y después de emplear las soluciones más concentradas se mantuvieron congeladas a -15°C .

Todos los fármacos fueron empleados en estado de sal y expresados como concentración molar final en el baño de órganos.

Respuesta al cloruro potásico

Al final de cada situación experimental se añadió al cilindro vascular cloruro potásico 150 mM con objeto de tener una población homogénea de resultados en lo referente al estado fisiológico del segmento arterial. Se desecharon aquellos segmentos que dieran una contracción menor de 500 mg, ya que el ClK actúa produciendo despolarización del músculo liso y no por activación nerviosa (Urquilla y col., 1975).

El valor medio de la contracción arterial obtenido por potasio fue de 1044 ± 36 mg.

Determinación fluorométrica de noradrenalina

La noradrenalina presente en las terminaciones nerviosas perivasculares pertenecientes al polígono de Willis se determinó espectrofluorométricamente mediante el método de la formación del fluoróforo trihidroxi-indol según la técnica de Shellenberger y col. (1972). Fue necesario reunir arterias cerebrales de 2 ó 3 cabras para tener cantidad suficiente de tejido y poder realizar el

análisis fluorométrico; el peso de cada muestra analizada era de 100 a 170 mg. La recuperación de noradrenalina fue del 60%.

Las lecturas se hicieron en un espectrofluorómetro Aminco Bowman a una longitud de onda para la excitación de 380 nm y para la emisión de 495 nm.

Fármacos y otros productos empleados

Clorhidrato de cocaína (Abelló)

Clorhidrato de fentolamina (Regitina Ciba)

Reserpina (Serpasol Ciba)

Tetrodotoxina (Sankyo)

Tosilato de bretilio (Burroughs Wellcome)

Bitartrato de noradrenalina (Sigma)

Clorhidrato de tiramina (Sigma)

ClNa (Carlo Erba)

ClK (Carlo Erba)

SO₄Mg (Carlo Erba)

Cl₂Ca (Panreac)

PO₄H₂K (Merck)

CO₃HNa (Merck)

Glucosa (Carlo Erba)

EDTA (Sigma)

Acido ascórbico (Merck)

Análisis estadístico de los datos

Los resultados vienen expresados en miligramos.

Los métodos estadísticos empleados son los descritos por Snedecor (1956) y la mecanización de los mismos se hizo con el microcomputador Olivetti P 602.

Se aplicó la "t" de Student para la prueba de significación de promedios, teniendo en cuenta que una probabilidad menor del 5% en favor de la hipótesis de nulidad fue considerada de valor estadístico.

RESULTADOS

ESTIMULACION ELECTRICA DE CAMPO DE LAS ARTERIAS CEREBRAL MEDIA Y COMUNICANTE POSTERIOR

La estimulación eléctrica del segmento arterial aislado provocó un incremento de tensión dependiente de la frecuencia. A 32 Hz, máxima frecuencia utilizada, la arteria cerebral media experimentó un incremento de tensión de 628 ± 61 mg, mientras que en la arteria comunicante posterior fue de 644 ± 99 mg.

La figura 3, muestra un registro de la contracción de la arteria cerebral media aislada de cabra utilizando varias frecuencias de estimulación y pulsos de 0.5 mseg. de duración.

La figura 4 muestra efectos similares cuando se utilizan pulsos de corta duración (0.2 mseg) con la misma frecuencia y dejando 7-8 minutos entre cada estimulación.

Los siguientes experimentos se realizaron con el fin de estudiar los posibles mecanismos adrenérgicos implicados en la contracción del vaso:

1. Por acción de la tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6}$ M) fue reducido significativamente el efecto contráctil obtenido por el estímulo eléctrico a todas las frecuencias utilizadas. Para la arteria cerebral media ($p < 0.001$)

en todos los puntos) y para la arteria comunicante posterior ($p < 0.01$) (Figuras 5, 6 y 7).

2. La adición de fentolamina ($10^{-6}M$), bloqueante adrenérgico alfa, produjo una disminución de la respuesta contráctil al estímulo que fue estadísticamente significativa con respecto a la respuesta control en todas las frecuencias empleadas ($p < 0.001$) (Figuras 8 y 9).

3. El bloqueante neuronal adrenérgico bretilio ($5 \cdot 10^{-5}M$) eliminó parcialmente la contracción producida por la estimulación eléctrica ($p < 0.001$) (Figuras 10 y 11).

4. La adición de cocaína ($10^{-6}M$) no modificó la contracción inducida por el estímulo eléctrico en ninguna de las frecuencias empleadas ($p > 0.5$) Figuras 12 y 13).

5. Con el fin de vaciar las vesículas sinápticas de su contenido en catecolaminas, a un grupo de cabras se trató previamente con reserpina. En la figura 14 tenemos los resultados obtenidos de la estimulación eléctrica de segmentos vasculares procedentes de estos animales. La respuesta contráctil está significativamente disminuida en relación con las normales ($p < 0.01$) Fi-

gura 15).

6. Segmentos arteriales procedentes de animales a los que 15 días antes se les había practicado una gangliectomía simpática cervical superior y bilateral, mostraron una disminución de su capacidad contráctil estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Figura 16 y 17).

Sin embargo, en cilindros arteriales procedentes de estos animales aparece una pequeña contracción como respuesta al estímulo eléctrico. Con el fin de conocer si esta contracción era de origen nervioso, arterias procedentes de cabras denervadas fueron estimuladas eléctricamente en presencia de fentolamina (10^{-6} M) o de tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6}$ M). En ambos casos no hubo diferencias significativas respecto a sus controles, indicando que la contracción era debida a estimulación directa de células de la musculatura lisa del vaso (Figuras 18, 19, 20 y 21).

En las tablas I y II se resumen las respuestas máximas obtenidas por estimulación eléctrica en cada una de las situaciones experimentales anteriores y el número de casos para cada uno de ellos.

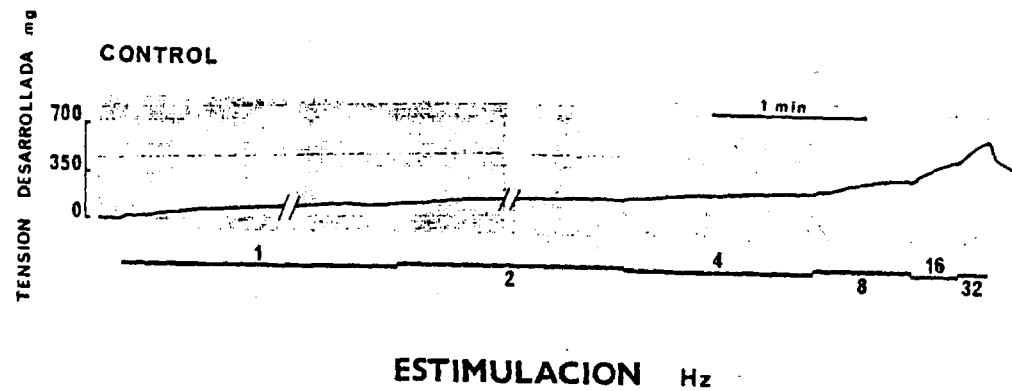


Figura 3.- Registro del efecto de la estimulación eléctrica de tipo acumulativo en un segmento vascular a distintas frecuencias, trenes de 300 impulsos, de 0.5 msec de duración de pulso y a voltaje supra-máximo.

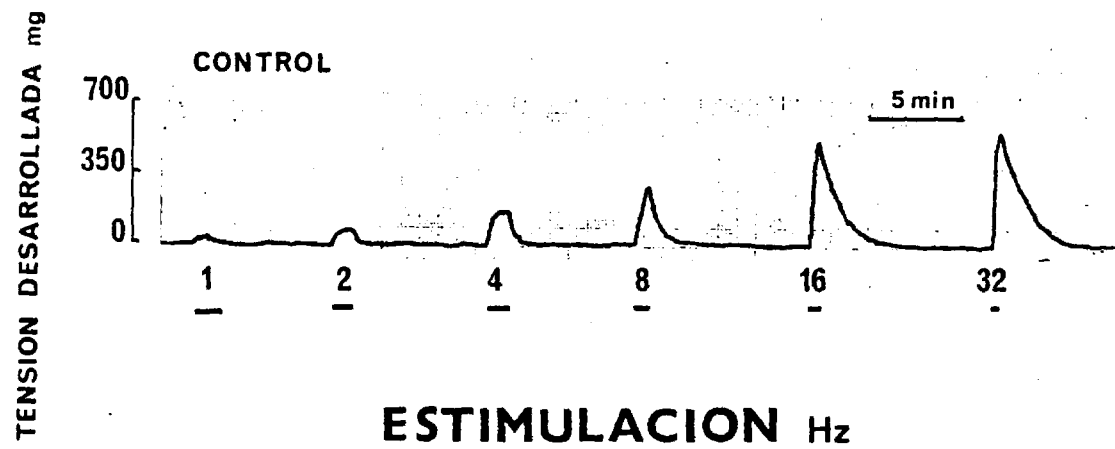


Figura 4.- Registro del efecto de la estimulación eléctrica de campo en un segmento vascular a distintas frecuencias y 0.2 msec de duración de pulso.

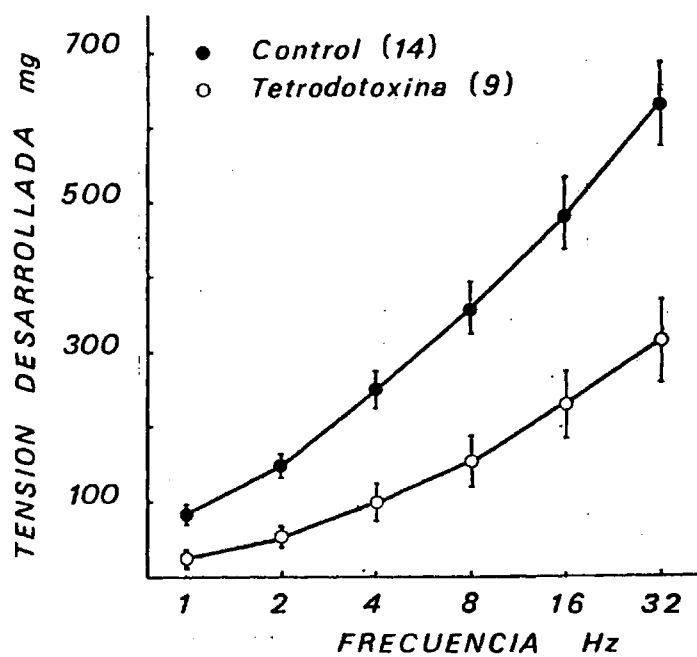


Figura 5.- Efecto de la estimulación eléctrica de campo sobre segmentos de arteria cerebral media de cabras normales con y sin tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6}$ M). Los números entre paréntesis indican los segmentos empleados para la curva. Las barras verticales representan los errores standard correspondientes (\pm ES).

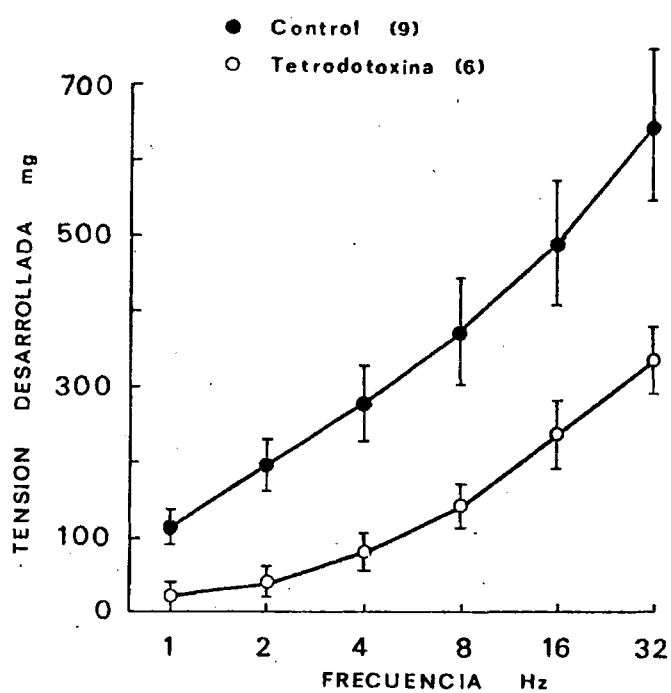


Figura 6.- Acción de la tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6}$ M) sobre la curva frecuencia-respuesta de la arteria comunicante posterior. Si se compara esta gráfica con la anterior puede verse que no hay diferencias significativas entre ambas por lo que a partir de aquí nos referiremos a la arteria cerebral media.

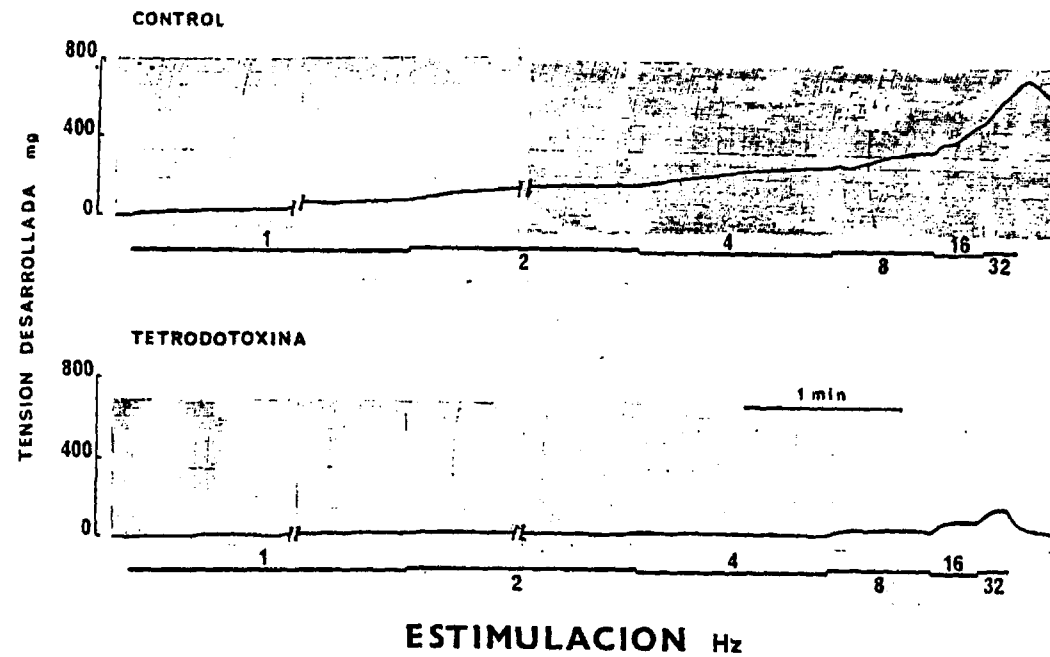


Figura 7.- Efecto de la tetrodotoxina sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico en un segmento de arteria comunicante posterior.

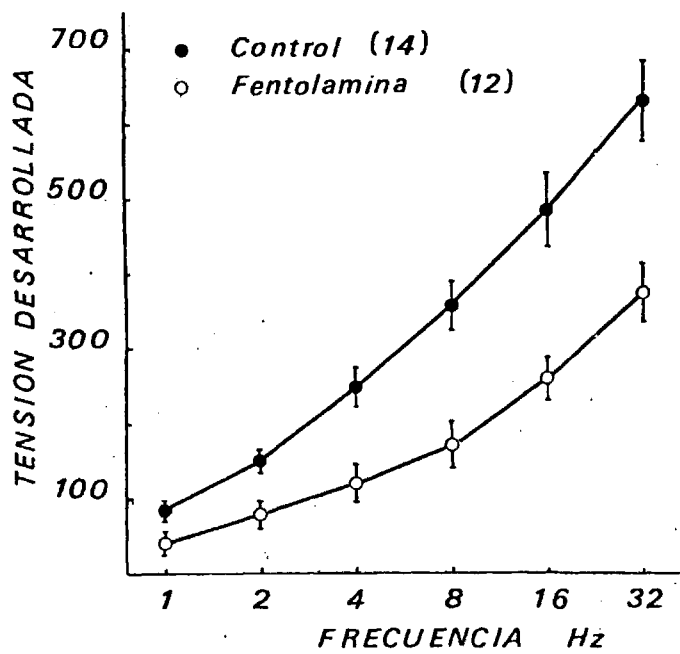


Figura 8.- Acción de la fentolamina (10^{-6} M) sobre la curva frecuencia-respuesta.

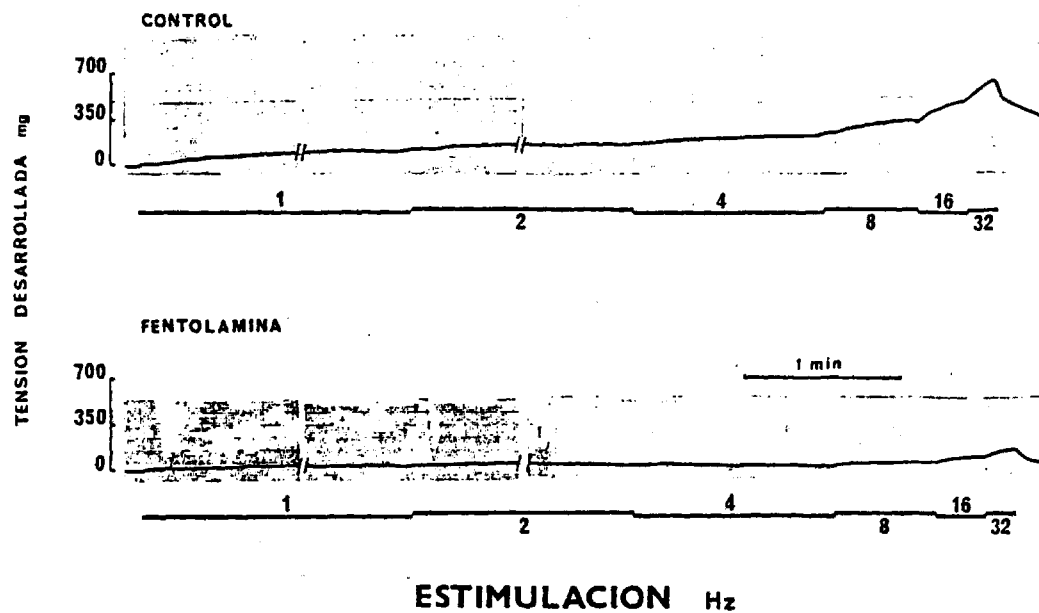


Figura 9.- Efecto de fentolamina sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico en un segmento de arteria cerebral media.

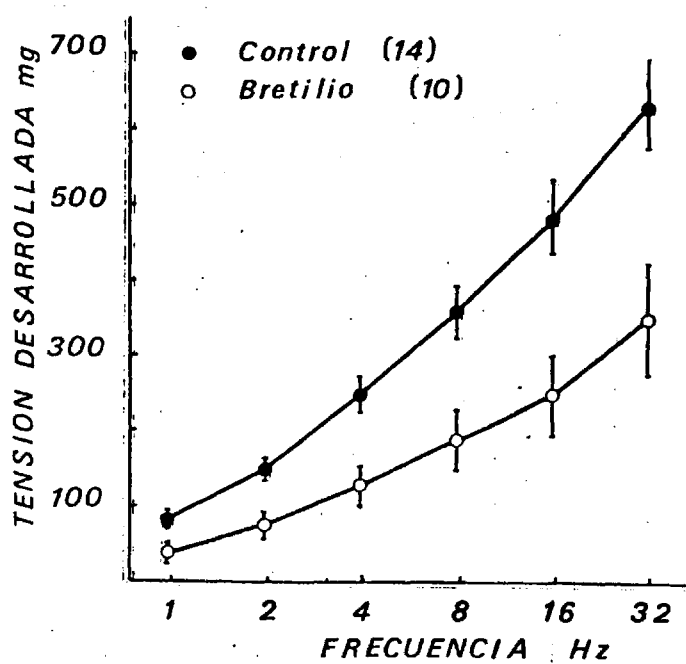


Figura 10.- Efecto del bretilio ($5 \cdot 10^{-5}$ M) sobre la curva frecuencia-respuesta.

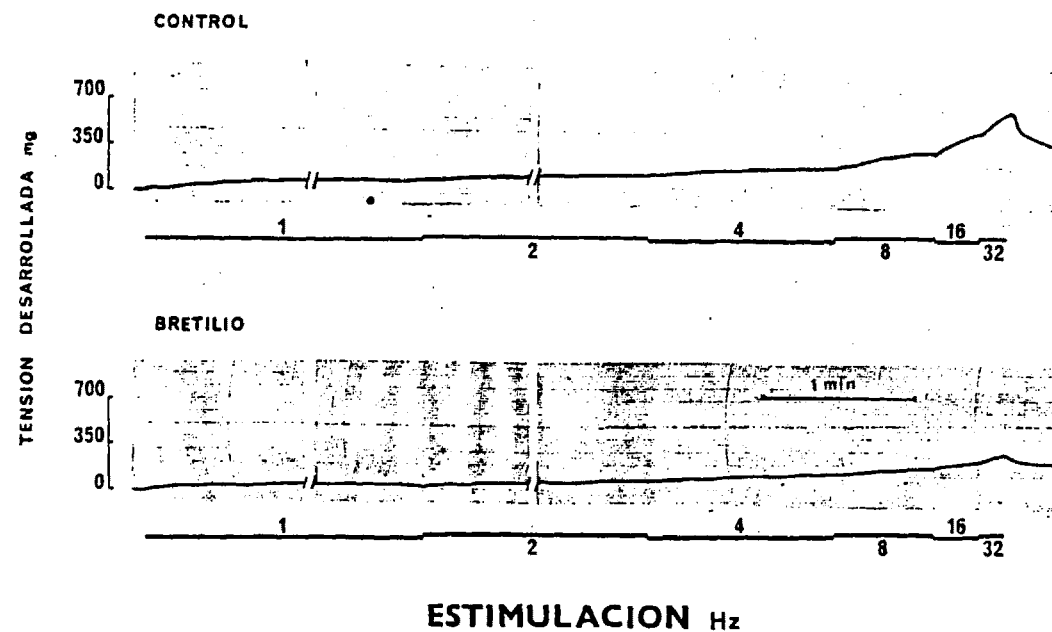


Figura 11.- Efecto del bretilio sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico en un segmento de arteria cerebral media.

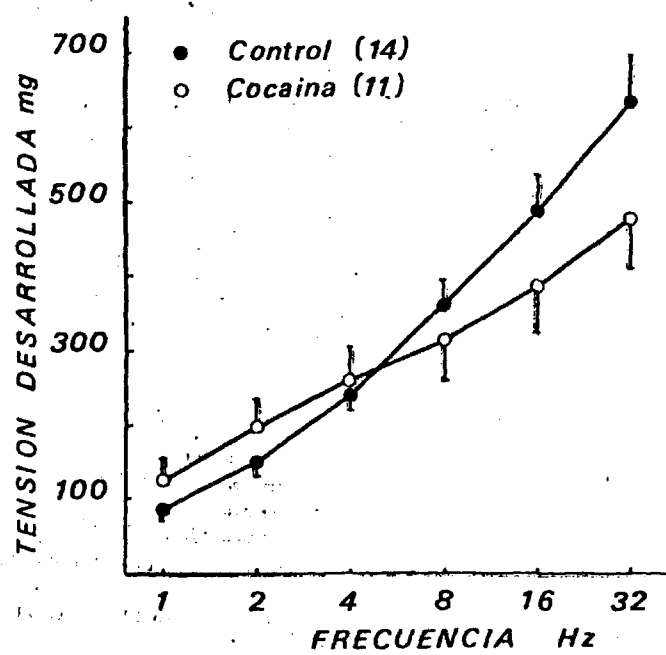


Figura 12.- Efecto de la cocaína (10^{-6} M) sobre la curva frecuencia-respuesta.

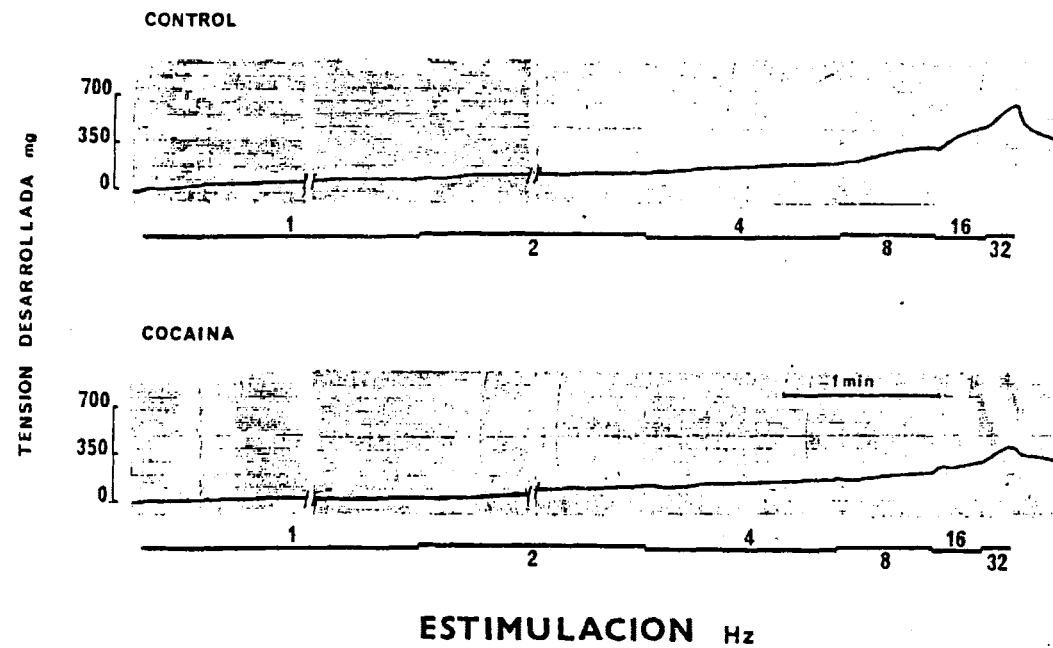


Figura 13.- Efecto de la cocaína sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico en un segmento de arteria cerebral media.

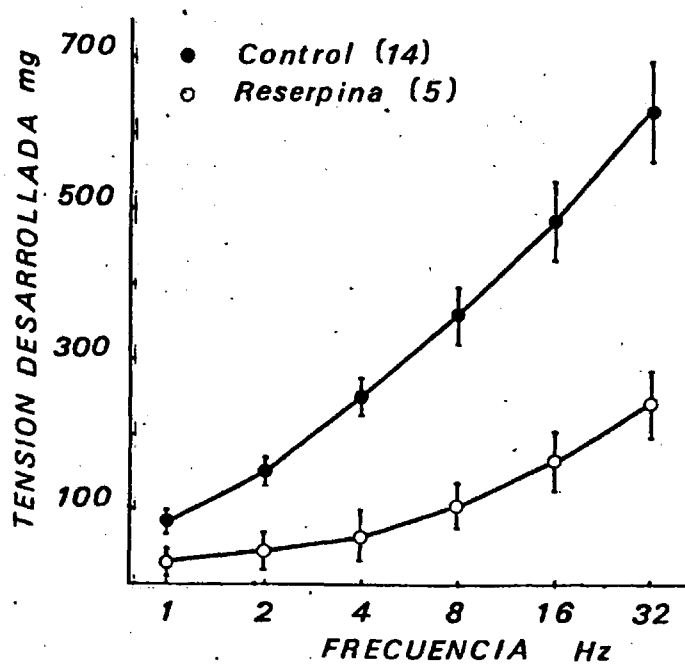


Figura 14.- Efecto del tratamiento previo de los animales con reserpina sobre la curva frecuencia-respuesta.

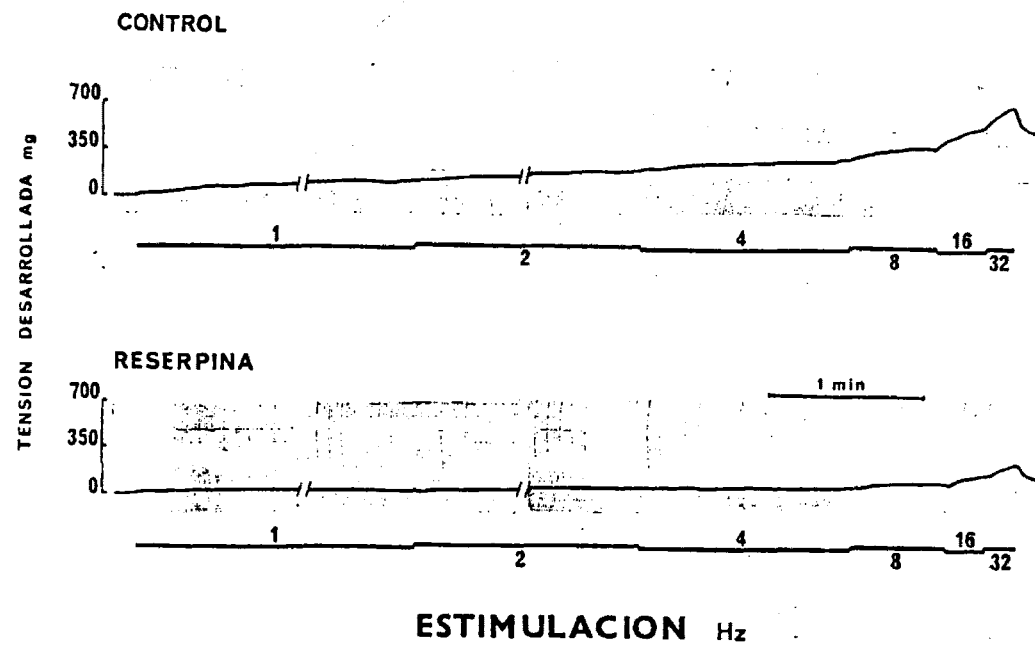


Figura 15.- Registro del efecto de la estimulación eléctrica de campo en un segmento de arteria cerebral media procedente de un animal previamente tratado con reserpina.

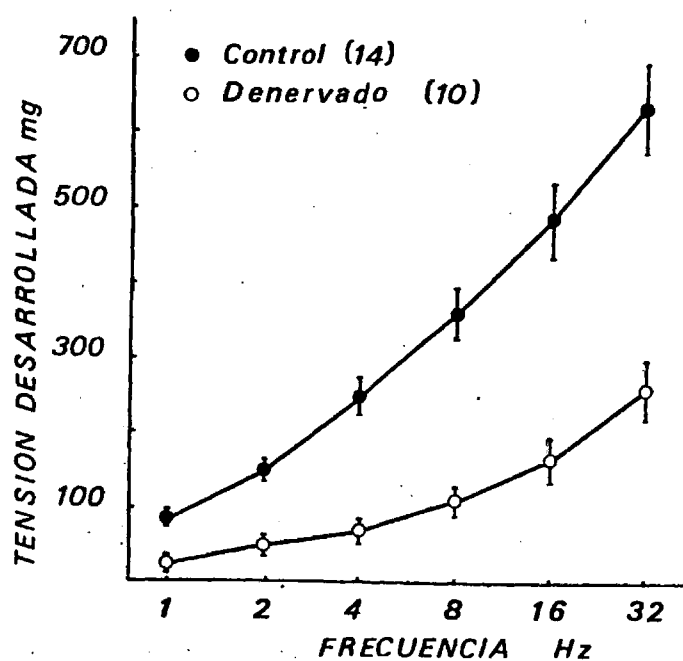


Figura 16.- Curvas frecuencia-respuesta realizadas en segmentos arteriales normales y en segmentos procedentes de animales a los que se extirpó ambos ganglios cervicales superiores 12 días antes de efectuar el experimento.

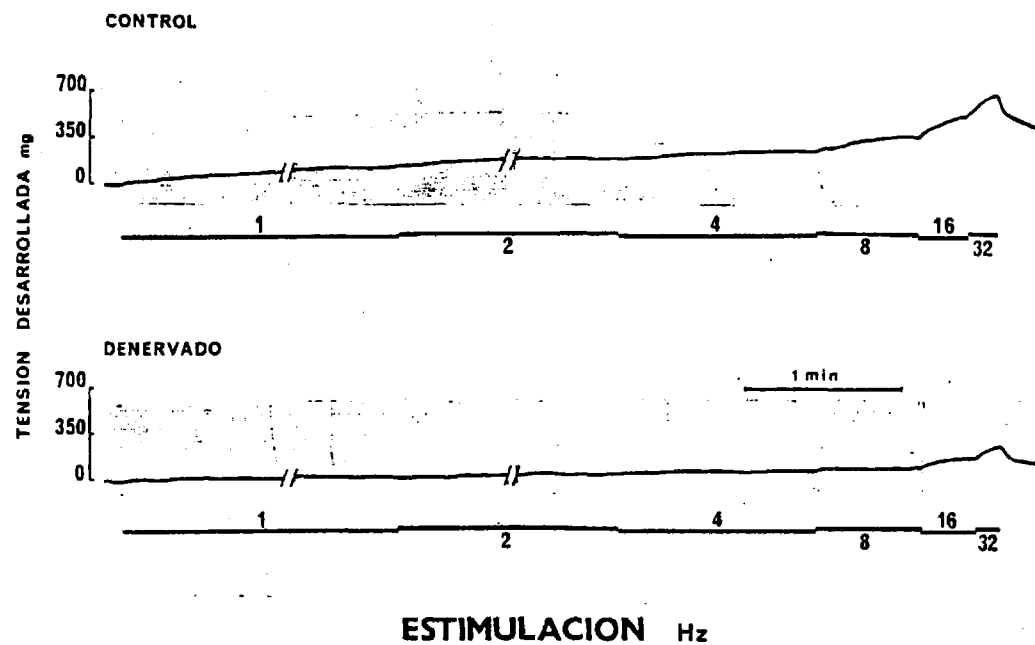


Figura 17.- Registro del efecto de la estimulación eléctrica de campo en un segmento de arteria cerebral media procedente de un animal al que se extirpó ambos ganglios simpáticos cervicales superiores 12 días antes de efectuar el experimento.

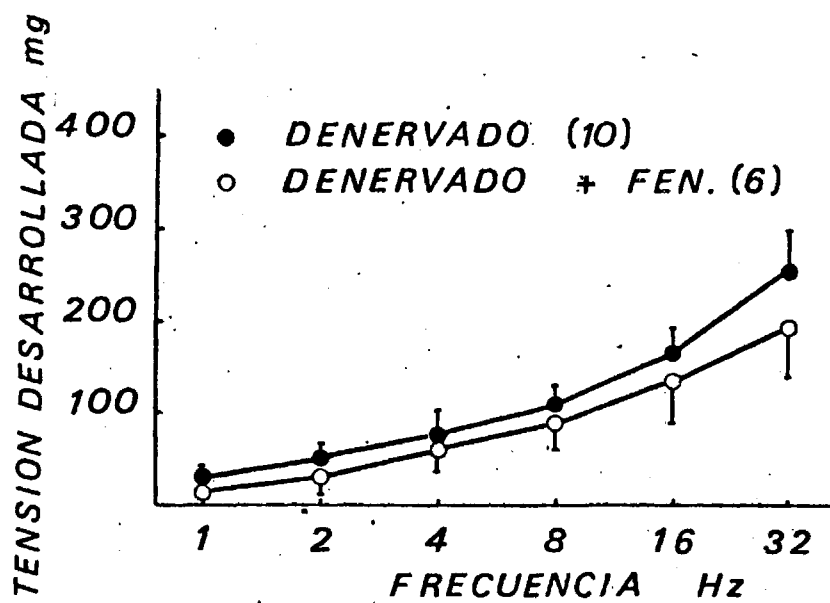


Figura 18.- Acción de la fentolamina (10^{-6} M) sobre la curva frecuencia-respuesta realizada en segmentos procedentes de animales denervados.

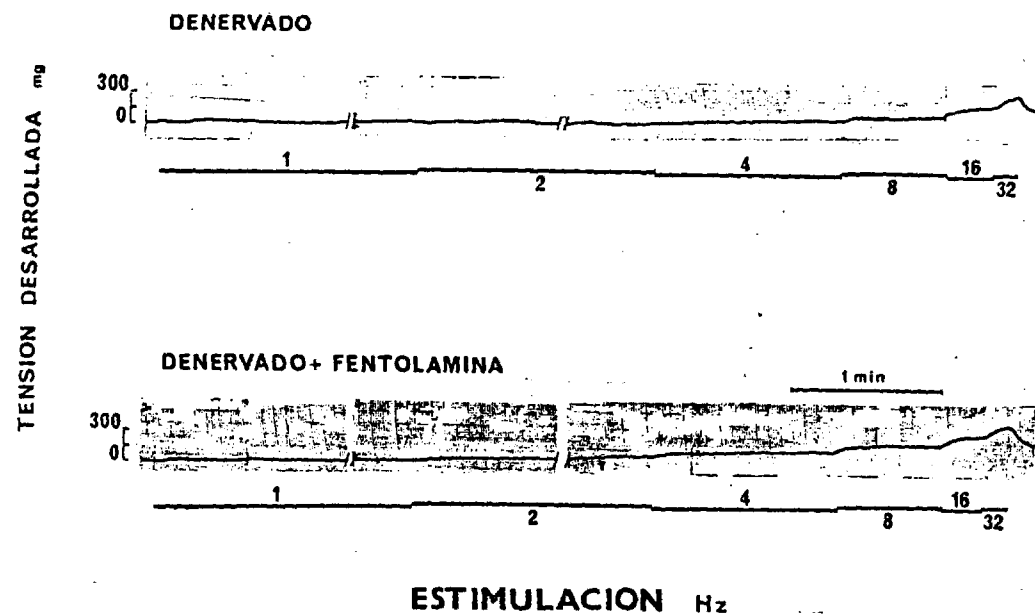


Figura 19.- Efecto de la fentolamina sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico en un segmento de arteria cerebral media procedente de un animal denervado.

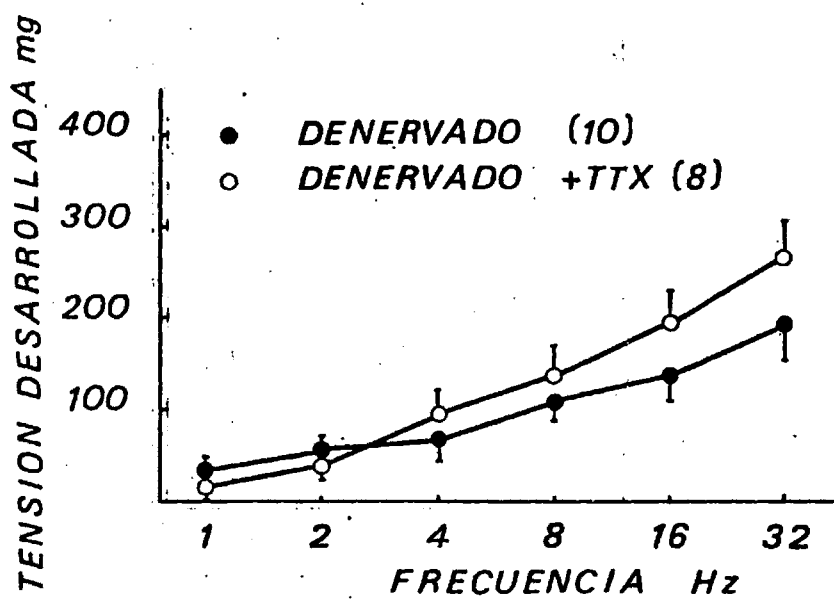


Figura 20.- Acción de la tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6}$ M) sobre la curva frecuencia-respuesta realizada en segmentos procedentes de animales denervados.

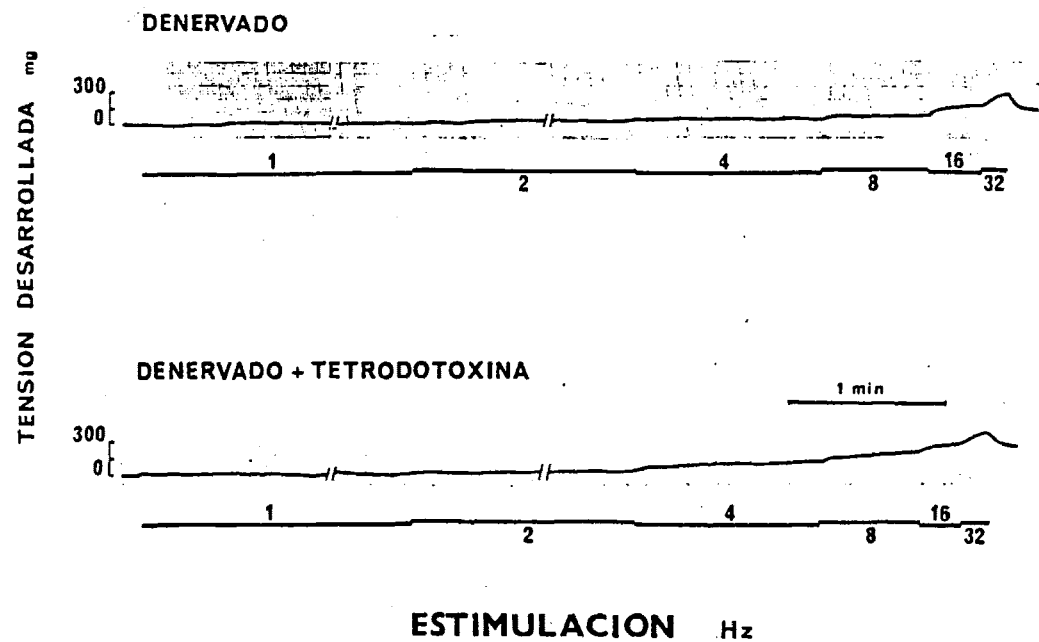


Figura 21.- Acción de tetrodotoxina sobre la contracción inducida por el estímulo eléctrico en un segmento de arteria cerebral media procedente de un animal denervado.

TABLA I. Respuesta contráctil de la arteria cerebral media aislada de cabra a la estimulación eléctrica (32 Hz, 0.5 mseg, voltaje supramáximo)

grupo	respuesta mg \pm ESM	n° Exp.
control	628 \pm 61	14
fentolamina	372 \pm 41*	12
tetrodotoxina	313 \pm 55*	9
bretilio	352 \pm 73*	10
cocaína	481 \pm 70	11
reserpina	240 \pm 43*	5
denervación	258 \pm 40*	10

* respuesta contráctil significativamente menor que la control ($p < 0.05$)

TABLA II. Respuesta contráctil de la arteria comunicante posterior de cabra a la estimulación eléctrica (32 Hz, 0.5 mseg, voltaje supramáximo)

grupo	respuesta mg \pm ESM	n° Exp.
control	644 \pm 96	10
fentolamina	196 \pm 33*	10
tetrodotoxina	336 \pm 44*	6
bretilio	345 \pm 84*	8
cocaína	570 \pm 119	3
reserpina	153 \pm 35*	6
denervación	116 \pm 37*	13

* respuesta contráctil significativamente menor que la control ($p < 0.05$)

RESPUESTA OBTENIDA POR DOSIS CRECIENTES DE
TIRAMINA EN ARTERIA CEREBRAL MEDIA AISLADA

El efecto de concentraciones crecientes de tiramina, fármaco simpatomimético de acción indirecta, produjo un incremento de tensión dependiente de la dosis, que a la máxima concentración empleada ($10^{-3}M$) fue de 640 ± 80 mg. (Figura 22).

Segmentos arteriales procedentes de animales a los que 15 días antes se les había practicado una gangliectomía simpática cervical superior y bilateral, mostraron una disminución de su capacidad contráctil, estadísticamente significativa, que a la máxima concentración de tiramina empleada ($10^{-3}M$) fue de 342 ± 68 mg (Figura 23).

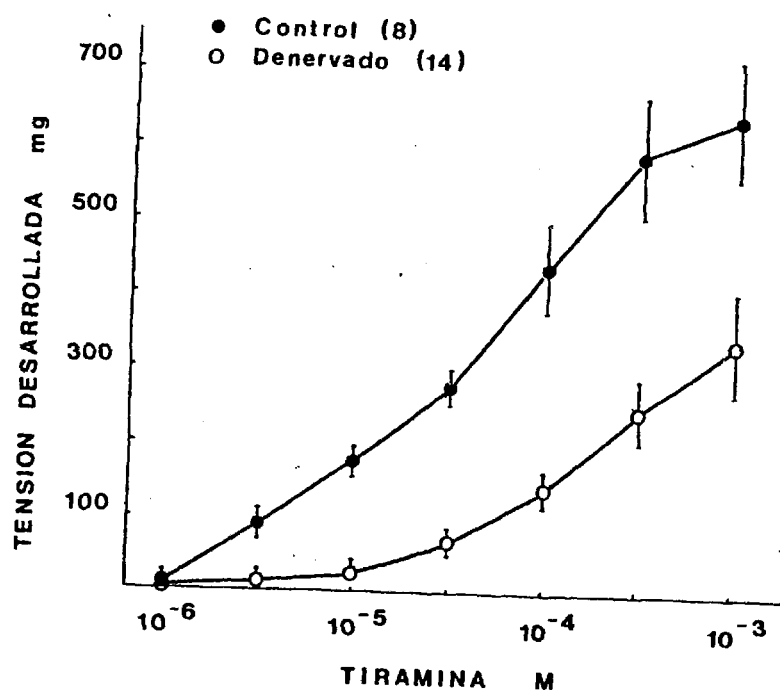


Figura 22.- Comparación de la curva a tiramina realizada en segmentos normales y en segmentos procedentes de animales a los que se extirpó ambos ganglios simpáticos cervicales superiores 12 días antes de efectuar el experimento.

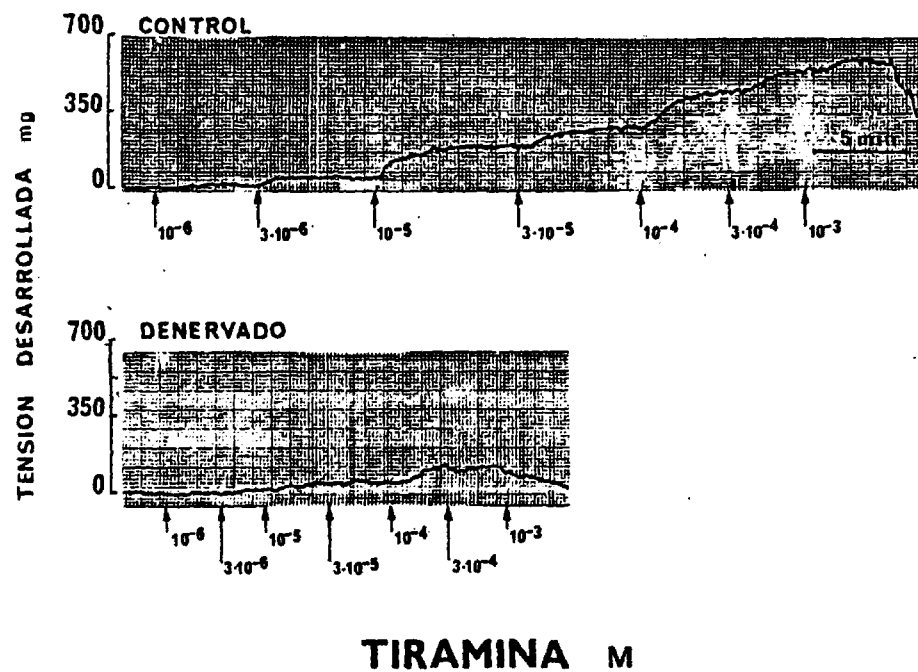


Figura 23.- Efecto de la tiramina sobre un segmento de arteria cerebral media procedente de animales control y denervados.

CANTIDAD DE NORADRENALINA MEDIDA POR FLUORO-
METRIA EN ARTERIAS CEREBRALES DE CABRA

Se midió la concentración de noradrenalina en arterias cerebrales de animales control, tratados con reserpina y gangliectomizados. Vasos cerebrales de cabras sin tratamiento previo contenían 2.10 μ g de noradrenalina por gramo de tejido, siendo indetectable en arterias procedentes de animales reserpinizados o gangliectomizados (Tabla III).

TABLA III. Concentración tisular de noradrenalina en arterias cerebrales procedentes de cabras control, tratadas con reserpina y gangliectomizadas.

	<u>$\mu\text{g Na/g tejido} \pm \text{ESM}$</u>
control	2.10 ± 0.11
(*n=4)	
reserpina	indetectable**
(n=3)	
denervado	indetectable
(n=4)	

*n, número de muestras (3 animales por muestra)

** $\frac{\text{fluorescencia de la muestra}}{\text{fluorescencia del blanco}} < 1.0$

DISCUSSION

Los efectos vasomotores de las fibras nerviosas simpáticas presentes en los vasos sanguíneos cerebrales han sido puestos de manifiesto tanto en diversos animales de laboratorio como en el hombre mediante estimulación eléctrica de la cadena simpática cervical (Krog, 1964; James y col., 1969; D'Alecy 1973), extirpación del ganglio simpático cervical superior (Iwayama, 1970; Alborch y col., 1977) y por administración de fármacos activos sobre neuronas adrenérgicas (Lluch y col., 1973 ; Sercombe y col., 1975; Gómez y col., 1976).

Por otra parte, estudios in vitro e in vivo han demostrado que los vasos cerebrales poseen receptores adrenérgicos alfa y beta (Lluch y col., 1973; Edvinsson y Owman, 1974; Urquilla y col., 1975) y que responden a los fármacos autónomos de forma semejante a la de otros lechos vasculares (Nielsen y Owman, 1971; Edvinsson y col., 1974; Lee y col., 1975). Hasta el momento actual, las investigaciones llevadas a cabo mediante estimulación eléctrica de campo del cilindro arterial aislado han dado lugar a resultados dispares (Kuschinsky y Wahl, 1978). Toda y Fujita (1973) no han encontrado una respuesta contráctil frente al estímulo eléctrico en tiras de arteria basilar de perro. Sin embargo, Bevan y Bevan (1973), en segmentos arteriales proceden-

tes de cerebro de conejo, observan un aumento de tensión producido por el estímulo eléctrico. Edvinsson y col. (1976) ponen de manifiesto contracción de arterias humanas de la pia aisladas que es dependiente de la frecuencia de estimulación e inhibida por guanetidina, lo cual hace pensar en un posible papel funcional de las terminaciones nerviosas perivasculares que previamente habían sido demostradas por histofluorescencia.

Aunque no podemos excluir diferencias debidas a especies animales distintas, las tiras en espiral que emplean Toda y Fujita sufren mayor trauma durante la disección que los segmentos vasculares utilizados por los investigadores anteriormente citados y en los presentes experimentos.

Nuestros resultados muestran que la estimulación eléctrica de la arteria cerebral media aislada produce una contracción dependiente de la frecuencia utilizada. Esta respuesta contráctil es debida, en gran parte, a la liberación del neurotransmisor adrenérgico noradrenalina, puesto que disminuye significativamente con el tratamiento previo con tetrodotoxina, bretilio, fentolamina, reserpina y gangliectomia simpática bilateral cervical superior. Estos resultados confirman observaciones semejantes realizadas en cabras despiertas, que

muestran una disminución del flujo sanguíneo cerebral producido por estimulación eléctrica de la cadena simpática cervical (Lluch y col., 1975).

La disminución significativa de la respuesta contráctil obtenida por estimulación eléctrica en presencia de tetrodotoxina sugiere que la contracción es de naturaleza neurógena, puesto que este fármaco actúa impidiendo la conducción del impulso nervioso (Kao, 1966). De acuerdo con estos resultados, experimentos realizados en arterias cerebrales aisladas de conejo o de perros han demostrado que las contracciones vasculares producidas por estimulación son suprimidas por tetrotoxina (Bevan y Bevan, 1973; Lee y col., 1975; Muramatsu y col., 1978).

Por acción del bretilio, fármaco bloqueante neuronal, aparece significativamente disminuida la respuesta contráctil del segmento arterial al estímulo eléctrico. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de Lee y col. (1976), Muramatsu y col., (1978) y refuerzan la hipótesis de la naturaleza neurógena de la contracción.

Con el fin de investigar si la contracción era debida a la liberación de la noradrenalina presente en las terminaciones simpáticas de las paredes de los va-



sos, se estimularon eléctricamente segmentos vasculares procedentes de 1) animales tratados previamente con reserpina y 2) animales a los que 15 días antes de les había extirpado ambos ganglios simpáticos cervicales superiores. En los animales reserpinizados hubo una disminución significativa de la respuesta contráctil con respecto a los controles, indicando por tanto la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas perivasculares. Es de notar que la velocidad de recambio de esta catecolamina en las arterias cerebrales de cabra es muy grande pues basta un tratamiento de 0.02 mg/kg/día de reserpina durante tres días para que el contenido de noradrenalina descienda a niveles indetectables.

Los experimentos descritos apoyan las observaciones morfológicas que demuestran la desaparición de la fluorescencia típica de noradrenalina en cortes histológicos de los vasos cerebrales de animales tratados con reserpina (Nielsen y Owman, 1967). Por otra parte, experimentos realizados en cabras sin anestésicar han demostrado que la reducción del flujo sanguíneo cerebral producida por estimulación eléctrica de la cadena simpática cervical, es parcialmente eliminada por el tratamiento previo del animal con reserpina (Lluch y col., 1975).

Cuando se estimularon eléctricamente cilindros

arteriales procedentes de animales a los que 15 días antes se les había extirpado ambos ganglios simpáticos cervicales superiores, se produjo una curva frecuencia-tensión desplazada a la derecha con respecto a la curva obtenida en segmentos normales. Estos resultados coinciden con estudios morfológicos utilizando microscopio de fluorescencia que demuestran la casi total desaparición de las vesículas sinápticas conteniendo catecolaminas después de haber producido la denervación quirúrgica (Nielsen y Owman, 1967; Hernández-Pérez y Stone, 1974). Los resultados obtenidos por gangliectomía sugieren la participación de las fibras simpáticas procedentes de estos ganglios en la respuesta contráctil de los segmentos arteriales producida por estimulación eléctrica; además estas observaciones refuerzan la hipótesis del posible papel funcional de estas fibras nerviosas perivasculares. En efecto, la extirpación del ganglio simpático cervical superior produce un aumento considerable del flujo sanguíneo cerebral en la cabra, que es probablemente debido a la pérdida de un tono adrenérgico existente en los vasos cerebrales en condiciones fisiológicas (Alborch y col., 1977).

En presencia de cocaína, la estimulación eléctrica no produjo potenciación de la respuesta contráctil.

Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en arteria de la oreja de conejo (de la Lande y col., 1976) y en arteria basilar (Lee y col., 1976) que muestran la escasa potenciación, inducida por la cocaína, de la respuesta contráctil al estímulo eléctrico.

Experimentos recientes en cabras sin anestesiarse han mostrado igualmente que la cocaína no potencia la disminución del flujo sanguíneo cerebral producida por estimulación eléctrica del nervio simpático cervical (Lluch y col., 1975). En relación con estas observaciones, se ha visto en vasos sanguíneos del conejo, gatos y cobayos que la recaptación neuronal de noradrenalina es de poca importancia (Berkowitz y col., 1971). Es posible que las arterias cerebrales de la cabra tengan características semejantes a las de aquellos vasos y por ello la cocaína no pueda potenciar la vasoconstricción inducida por el estímulo nervioso.

La disminución de la respuesta contráctil después de utilizar fentolamina, indica que gran parte de la contracción muscular provocada por la estimulación eléctrica está mediada por una activación de receptores adrenérgicos alfa. La participación de estos receptores concuerda con experimentos in vivo (Lluch y col., 1975) que muestran que al administrar directamente en la cir-

culación cerebral fentolamina se elimina parcialmente la reducción del flujo sanguíneo cerebral producida por el estímulo eléctrico.

Recientemente Lee y col. (1976) encuentran respuesta vasoconstrictora de la arteria basilar de conejo a la estimulación eléctrica de campo; la contracción vascular es suprimida tanto por reserpinización crónica o extirpación de ambos ganglios cervicales superiores como por el tratamiento del segmento arterial con bloqueantes neuronales adrenérgicos, guanetidina y bretilio. Esta respuesta parece ser el resultado de estimular neuronas simpáticas de tipo adrenérgico. Sin embargo, el tratamiento con fentolamina (10 μ M) y fenoxibenzamina (10 μ M) no antagonizan la contracción vascular producida por estimulación eléctrica; por el contrario estos bloqueantes del receptor alfa adrenérgico aumentan la respuesta contráctil. Dosis mayores de fentolamina y fenoxibenzamina no sólo bloquean la contracción neurogénica sino que también eliminan la respuesta producida al estimular directamente el músculo mediante pulsos de larga duración. Estos resultados sugieren, por tanto, que la noradrenalina podría ser solo uno de los varios agentes excitadores que se liberarían desde los nervios postganglionares hasta los vasos cerebrales. En efecto, anteriormente Am-

bache y Zar (1971), y Wakade y Krusz (1972) hicieron la misma observación basada en experimentos realizados en cobayos pues la fentolamina o la fenoxibenzamina no bloqueaban la respuesta contráctil nerviosa del conducto deferente producida por estimulación del nervio hipogástrico.

Aunque nuestros resultados no excluyen la existencia de otros neurotransmisores, muestran que la contracción de arterias cerebrales obtenida por estimulación eléctrica de campo es debida, en gran parte, a la liberación de noradrenalina endógena desde las terminaciones nerviosas perivasculares que a la vez activa los receptores alfa. Dosis de fentolamina (10^{-6} M) menores que las empleadas por Lee y col. (1976) producen aproximadamente el mismo desplazamiento de la curva control de estimulación que la reserpinización o la gangliectomía; este efecto probablemente es debido a un antagonismo del transmisor sobre el receptor alfa adrenérgico y no por una acción directa inespecífica de la fentolamina sobre el tejido muscular puesto que en segmentos procedentes de animales denervados, la fentolamina no elimina la contracción residual producida por el estímulo eléctrico.

La dosis de fentolamina empleada en nuestros

experimentos también reduce significativamente la contracción de arterias cerebrales aisladas de cabra o de perro producida por acción de la tiramina (Urquilla y col., 1974), por noradrenalina (Urquilla y col., 1975), o por ambos fármacos (Toda y col., 1978). De igual manera resultados obtenidos in vivo en perros anestesiados (D'Alecy 1973) y en cabras sin anestesiar (Lluch y col., 1975) ponen de manifiesto que por acción de fentolamina o fenoxibenzamina hay una reducción de la vasoconstricción cerebral producida por tiramina o por estimulación eléctrica del nervio simpático cervical; en ninguno de estos experimentos la fentolamina aumenta la respuesta nerviosa.

La contracción residual que hemos observado en cilindros arteriales procedentes de animales gangliectomizados, también la describe Wakade y Krusz (1972) al estimular eléctricamente el conducto deferente de cobayos tratados previamente con reserpina o en presencia de fenoxibenzamina; apoyándose en estos resultados se sugiere la hipótesis de que, además de noradrenalina, sea posible la existencia de otros neurotransmisores excitadores. Sin embargo, en nuestros experimentos, la contracción residual no fue modificada significativamente en presencia de tetrodotoxina, bloqueante del im-

pulso nervioso, indicando que dicho efecto probablemente sea debido a estimulación directa del músculo liso del vaso.

Los resultados hasta aquí descritos indican que la estimulación eléctrica de campo de las arterias cerebrales (media y comunicante posterior) de cabra da lugar a una respuesta contráctil dependiente de la frecuencia utilizada. La naturaleza neurógena de esta contracción viene dada por las siguientes observaciones experimentales:

- 1.- La respuesta contráctil se bloquea al añadir tetrodotoxina, fármaco que impide la transmisión del impulso nervioso.
- 2.- Tanto la reserpinización como la denervación y el bretilio disminuyen significativamente la respuesta al estímulo eléctrico.
- 3.- La estimulación produce la liberación del neurotransmisor que, a su vez, activa los receptores alfa adrenérgicos, ya que en presencia de fentolamina aparece reducida significativamente la respuesta contráctil.

El neurotransmisor adrenérgico también puede ser liberado desde las vesículas sinápticas de la terminación axonal por acción de la tiramina, fármaco de conocidas propiedades simpaticomiméticas indirectas. En efecto, nuestros resultados muestran que la arteria cerebral media aislada de cabra en presencia de tiramina produce una contracción dependiente de la dosis, que es debida a liberación de noradrenalina puesto que segmentos arteriales procedentes de animales a los que previamente se había extirpado ambos ganglios simpáticos cervicales superiores dan una disminución significativa de la contracción a todas las dosis de tiramina empleadas.

Nielsen y col. (1971) encuentran en arteria cerebral media aislada de gato que la tiramina no produce respuesta contráctil si el animal ha sido previamente tratado con reserpina. Con estos resultados están de acuerdo los obtenidos por Urquilla y col. (1974) mediante determinación fluorométrica de noradrenalina en arterias del polígono de Willis de cabra. La cantidad de noradrenalina es indetectable si el animal ha sido reserpinizado. Tiras de arterias cerebrales de perro responden a la tiramina con una contracción dependiente de la dosis (Toda y col. 1978) que es parcialmente eliminada en presencia de fentolamina. La respuesta con-

tráctil de arterias cerebrales parece estar asociada con la estimulación de receptores adrenérgicos alfa.

Estos experimentos en arteria aislada refuerzan los encontrados en animales despiertos que muestran una disminución del flujo sanguíneo cerebral producido por la tiramina (Lluch y col., 1975); el tratamiento previo con reserpina o el bloqueo de los receptores alfa adrenérgicos con fentolamina reducen la vasoconstricción cerebral producida por tiramina. Los resultados expuestos indican que la respuesta vasoconstrictora es debida, en gran parte, a la liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas presentes en los vasos cerebrales.

En nuestros experimentos el contenido de noradrenalina en tejido vascular del polígono de Willis de cabra es indetectable después que el animal ha sido reserpinizado o denervado. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por fluorometría o histofluorescencia de vasos de la pia de conejos (Owman y col. 1974); Sercombe y col. 1975) y monos (Hernández-Pérez y col. 1975). Puesto que los niveles tisulares de noradrenalina parecen estar asociados con la densidad de fibras nerviosas adrenérgicas, es probable que la gran concentración de esta catecolamina en los vasos cerebrales de ca-

bra sea reflejo de una abundante inervación simpática. Estos resultados confirman de nuevo la presencia de noradrenalina en vasos cerebrales de la pia de cabra y de que la mayoría de las fibras nerviosas simpáticas que llegan a ellos tienen su origen en el ganglio simpático cervical superior.

RESUMEN

El presente trabajo ha sido llevado a cabo con el objeto de poner de manifiesto la actividad funcional de terminaciones nerviosas simpáticas en arterias aisladas del polígono de Willis de cabra.

Después de sacrificado el animal se procedió a la extracción del cerebro, se disecaron cilindros vasculares, de 4 mm de longitud, de arteria cerebral media y arteria comunicante posterior que eran montadas de acuerdo con el método descrito por Nielsen y Owman (1971) para el registro isométrico de contracciones.

Para realizar la estimulación eléctrica de campo se conectaron a un estimulador dos electrodos de platino situados a ambos lados del segmento arterial. Se emplearon trenes de 300 impulsos, a voltaje supramáximo, de 0.5 mseg de duración y frecuencia de 1, 2, 4, 8, 16 y 32 Hz; las curvas frecuencia-respuesta fueron de tipo acumulativo.

Se realizaron experimentos de estimulación eléctrica en segmentos arteriales procedentes de animales que tenían agotado el contenido de catecolaminas de las vesículas sinápticas por acción de reserpina, o bien se les había producido degeneración de las terminales nerviosas perivasculares mediante extirpación de ambos ganglios simpáticos cervicales superiores.

Cuando se estimularon eléctricamente segmentos arteriales en presencia de fármacos, estos se añadieron al baño de órganos 10 minutos antes de comenzar el experimento y estuvieron en contacto con el tejido vascular durante la realización de la curva de estimulación.

Se efectuaron curvas dosis-efecto para tiramina en dosis acumuladas. Fue empleada en estado de sal y expresado como concentración molar final en el baño de órganos.

La noradrenalina presente en las terminaciones nerviosas perivasculares pertenecientes al polígono de Willis se determinó espectrofluorométricamente mediante el método de la formación del fluoróforo trihidroxi-indol según la técnica de Shellenberger y col. (1972).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1. La estimulación eléctrica del segmento arterial aislado provoca un incremento de tensión dependiente de la frecuencia.

2. La respuesta contráctil se bloquea al añadir tetrodotoxina ($3 \cdot 10^{-6} M$), fármaco que impide la transmisión del impulso nervioso.

3. Tanto la reserpinización como la denervación y el bretilio ($5 \cdot 10^{-5} M$) disminuyen significativamente la respuesta al estímulo eléctrico.

4. En cilindros arteriales procedentes de animales denervados hay una contracción como respuesta al estímulo eléctrico que no desaparece en presencia de tetrodotoxina o de fentolamina en ninguna de las frecuencias empleadas.

5. La estimulación eléctrica produce la liberación del neurotransmisor que, a su vez, activa los receptores alfa adrenérgicos, ya que en presencia de fentolamina (10^{-6} M) aparece reducida significativamente la respuesta contráctil.

6. La adición de cocaína (10^{-6} M) no modifica la contracción inducida por el estímulo eléctrico en ninguna de las frecuencias empleadas.

7. Concentraciones crecientes de tiramina producen un incremento de tensión dependiente de la dosis. Segmentos arteriales procedentes de animales denervados, muestran una disminución de su capacidad contráctil estadísticamente significativa.

8. La medida fluorométrica de noradrenalina en vasos cerebrales del polígono de Willis de cabra, da un contenido de 2.10 μ g de noradrenalina por gramo de tejido, que es indetectable en arterias procedentes de animales reserpinizados o gangliectomizados.

CONCLUSIONES

1. La estimulación eléctrica de arterias cerebrales aisladas (media y comunicante posterior) de cabra produce una respuesta contráctil mediada por la liberación de noradrenalina de las terminaciones nerviosas presentes en las paredes del vaso.

2. Esta contracción es de naturaleza neurógena puesto que se bloquea en presencia de tetrodotoxina.

3. La respuesta contráctil es de tipo adrenérgico, ya que tanto la reserpinización como la denervación y el bretilio producen disminución significativa de la contracción vascular.

4. El transmisor liberado por el estímulo eléctrico activa los receptores alfa adrenérgicos, ya que en presencia de fentolamina aparece reducida la respuesta contráctil.

5. Las terminaciones nerviosas presentes en la pared del vaso cerebral proceden del ganglio simpático cervical superior ya que después de la denervación aparece significativamente reducida la respuesta.

6. Por acción de la tiramina, aparece contracción vascular que es debida a la liberación de noradrenalina ya que en segmentos procedentes de animales denervados aparece una disminución significativa de la contracción.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBORCH, E.; GOMEZ, B.; DIEGUEZ, G.; MARIN, J.
and LLUCH, S.: Cerebral blood flow and vascular
reactivity after removal of the superior cervi-
cal sympathetic ganglion in the goat. *Circulation*
Res. 41:278-282,1977.
2. AMBACHE, N. and ZAR, M.A.: Evidence against adre-
nergic motor transmission in the guinea-pig vas
deferens. *J. Physiol.* 216:359-389,1971.
3. BERKOWITZ, B.A.; TARVER, J.H.; and SPECTOR, S.:
Norepinephrine in blood vessels; concentration,
binding, uptake and depletion. *J. Pharmacol.*
Exp. Ther. 177:119-126,1971.
4. BEVAN, J.A. and BEVAN, R.D.: Localized neurogenic
vasoconstriction of the basilar artery. *Stroke.*
4:760-763,1973.
5. BOURA, A.L.A. and GREEN, A.F.: The actions of bre-
tylium: adrenergic neurone blocking and other
effects. *Brit. J. Pharmacol.* 14:536-548,1959.
6. CHENG, J.B. and SHIBATA, S.: Reactivity of isola-
ted bovine cerebral arteries to biogenic amines.
Gen. Pharmac. 9:189-193,1978.

7. CHOPOBSKI, J. and PENFIELD, W.: Cerebral vasodilator nerves and their pathway from the medulla oblongata. *Arch. Neurol. Psychiat.* 28:1257-1289, 1932.
8. DAHL, E.: The innervation of the cerebral arteries. *J. Anat.* 115:53-63, 1973.
9. D'ALECY, L.G. and FEIGL, E.O.: Sympathetic control of cerebral blood flow in dogs. *Circulation Res.* 31:267-283, 1972.
10. D'ALECY, L.G.: Sympathetic cerebral vasoconstriction blocked by adrenergic alpha-receptor antagonists. *Stroke.* 4:30-37, 1973.
11. DESHMUKH, V.D.; HARPER, A.M.; ROWAN, J.O. and JENNETT, W.B.: Studies on neurogenic control of the cerebral circulation. *Eur. Neurol.* 6:166-174, 1971.
12. ECCLES, J.: "The Synapse". In *Physiological Psychology. Readings from Scientific American.* pp. 131-146, WH Freeman and Company. San Francisco, 1973.
13. EDVINSSON, L.; NIELSEN, K.C.; OWMAN, C. and

- SPORRONG, B.: Cholinergic mechanisms in pial vessels. *Z. Zellforsch.* 134:311-325, 1972.
14. EDVINSSON, L.; OWMAN, C.; ROSENGREEN, E. and WEST, K.A.: Concentration of norepinephrine in pial vessels, choroid plexus, and iris during two weeks after sympathetic ganglionectomy or decentralization. *Acta Physiol. Scand.* 85:201-206, 1972.
15. EDVINSSON, L.; NIELSEN, K.C.; OWMAN, C. and WEST, K.A.: Evidence of vasoconstrictor sympathetic nerves in brain vessels of mice. *Neurology.* 23:73-77, 1973.
16. EDVINSSON, L.; NIELSEN, K.C. and OWMAN, C.: Influence of initial tension and changes in sensitivity during amine-induced contractions of pial arteries in vitro. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 208:235-242, 1974.
17. EDVINSSON, L. and OWMAN, C.: Pharmacological characterization of adrenergic alpha and beta receptors mediating the vasomotor responses of cerebral arteries in vitro. *Circulation Res.* 35: 835-849, 1974.

18. EDVINSSON, L.; OWMAN, C. and SJÖBERG, N.O.:
Autonomic nerves, mast cells, and amine receptors in human brain vessels. A histochemical and pharmacological study. Brain Res. 115:377-393, 1976.
19. EDVINSSON, L. and MAC KENZIE, E.T.: Amine mechanisms in the cerebral circulation. Pharmacol. Rev. 28:275-348, 1977.
20. EMMELIN, N. and TRENDELENBURG, U.: Degeneration activity after parasympathetic or sympathetic denervation. Rev. of Physiol. 66:147-211, 1972.
21. FITCH, W.; MAC KENZIE, E.T. and HARPER, A.M.:
Effects of decreasing arterial blood pressure on cerebral blood flow in the baboon; influence of the sympathetic nervous system. Circulation Res. 37:550-557, 1975.
22. FORBES, H.S. and WOLFF, H.G.: Cerebral circulation: III. Vasomotor control of cerebral vessels. Arch. Neurol. Psychiatry. 19:1057-1086, 1928.
23. GOMEZ, B.; ALBORCH, E.; DIEGUEZ, G. and LLUCH, S.: Presence of alpha- and beta-adrenergic tone in the walls of cerebral blood vessels. In: The

- Cerebral Vessel Wall, edited by J. Cervós-Navarro, E. Betz, F. Matakas, y R. Wüllenweber. New York: Raven Press, 1976, pp. 139-142.
24. HERNANDEZ-PEREZ, M.J. and STONE, H.L.: Sympathetic innervation of the circle of Willis in the macaque monkey. Brain Res. 80:507-511, 1974.
 25. IWAYAMA, T.: Ultrastructural changes in the nerve innervating the cerebral artery after sympathectomy. Z. Zellforsch. 109:465-480, 1970.
 26. IWAYAMA, T.; FURNESS, J.B. and BURNSTOCK, G.: Dual adrenergic and cholinergic innervation of the cerebral arteries of the rat. Circulation Res. 26:635-646, 1970.
 27. JAMES, I.M.; MILLAR, R.A. and PURVES, M.J.: Observations on the extrinsic neural control of cerebral blood flow in the baboon. Circulation Res. 25:77-93, 1969.
 28. KAO, C.Y.: Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. Pharmacol. Rev. 18:997-1049, 1966.
 29. KROG, J.: The effect of cervical sympathetic stimulation on cerebral blood flow in birds.

- J. Oslo City Hosp. 13:201-208,1963.
30. KROG, J.: Autonomic nervous control of the cerebral blood flow in man. J. Oslo City Hosp. 14: 25-33,1964.
 31. KUSCHINSKY, W. and WAHL, M.: Local chemical and neurogenic regulation of cerebral vascular resistance. Physiol. Rev. 58:656-689,1978.
 32. DE LA LANDE, I.S.; FREWIN, D. and WATERSON, J.G.: The influence of sympathetic innervation on vascular sensitivity to noradrenaline. Brit. J. Pharmacol. 31:82-93,1967.
 33. LEE, T.J-F.; SU, C. and BEVAN, J.A.: Nonsympathetic dilator innervation of cat cerebral arteries. Experientia. 31/12:1424-1426,1975.
 34. LEE, T.J-F.; SU, C. and BEVAN, J.A.: Neurogenic sympathetic vasoconstriction of the rabbit basilar artery. Circulation Res. 39:120-126,1976.
 35. LLUCH, S.; REIMAN, Ch. and GLICK, G.: Evidence for the direct effect of adrenergic drugs on the cerebral vascular bed of the unanesthetized goat. Stroke, 4:50-56,1973.
 36. LLUCH, S.; GOMEZ, B.; ALBORCH, E. and URQUILLA,

- R.: Adrenergic mechanisms in cerebral circulation of the goat. *Am. J. Physiol.* 228:985-989, 1975.
37. MARCO, E.; MARIN, J.; GOMEZ, B. and LLUCH, S.: Neurogenic vasoconstriction of the isolated middle cerebral artery of the cat. *Blood Vessels.* 12:370, 1975.
 38. MILLAR, R.A.: Neurogenic control of the cerebral circulation. *Int. Anest. Clin.* 7:539-556, 1969.
 39. MURAMATSU, I.; FUJIWARA, M.; OSUMI, Y. and SHIBATA, S.: Vasoconstrictor and dilator actions of nicotine and electrical transmural stimulation on isolated dog cerebral arteries. *Blood Vessels.* 15:110-118, 1978.
 40. NICKERSON, M. and COLLIER, B.: "Drugs inhibiting adrenergic nerves and structures innervated by them". En "The Pharmacological Basis of Therapeutics". 5^a Ed. Goodman, L.S., y Gilman, A. (Eds). pp. 531-564. Mac Millan Publishing Co. Inc. New York, 1975.
 41. NELSON, E. and RENNELS, M.: Innervation of intracranial arteries. *Brain.* 93:475-490, 1970.

42. NIELSEN, K.C. and OWMAN, C.: Adrenergic innervation of pial arteries related to the Circle of Willis in the cat. *Brain Res.* 6:773-776, 1967.
43. NIELSEN, K.C. and OWMAN, C.: Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 27:33-42, 1971.
44. NIELSEN, K.C.; OWMAN, C. and SPORRONG, B.: Ultrastructure of the autonomic innervation apparatus in the main pial arteries of rats and cats. *Brain Res.* 27:25-32, 1971.
45. NIELSEN, K.C.; OWMAN, C. and SPORRONG, B.: Sympathetic nervous control of pial arteries: Tyramine-induced contraction of the isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain and Blood Flow. Proc. Symp. Regulation of Cerebral Blood Flow*, 4 th, 1971, pp. 244-247.
46. OWMAN, C.; EDVINSSON, L. and NIELSEN, K.C.: Autonomic neuroreceptor mechanisms in brain vessels. *Blood Vessels.* 11:2-31, 1974.
47. PEERLESS, J. and YASARGIL, M.G.: Adrenergic innervation of the cerebral blood vessels in the

- rabbit. J. Neurosurg. 35:148-154,1971.
48. ROSEMBLUM, W.I.: Cerebral microcirculation: a review emphasizing the interrelationship of local blood flow and neuronal function. Angiology. 16:485-507,1965.
 49. SERCOMBE, R.; AUBINEAU, P.; EDVINSSON, L.; MAMO, H.; OWMAN, C.; PINARD, E. and SEYLAZ, J.: Neurogenic influence on local cerebral blood flow. Neurology. 25:954-963,1975.
 50. SHELLENBERGER, M.K. and GORDON, J.H.: A rapid, simplified procedure for simultaneous assay of norepinephrine, dopamine and 5-HT from discrete brain areas. Anal. Biochem. 39(2):356-372,1971.
 51. SNEDECOR, G.W.: An statistical methods. 5^a ed. Iowa State College. Press Amer., 1956.
 52. TODA, N. and FUJITA, Y.: Responsiveness of isolated cerebral and peripheral arteries to serotonin, norepinephrine and transmural electrical stimulation. Circulation Res. 33:98-104,1973.
 53. TODA, N.; HAYASHI, S. and HATTORI, K.: Analysis of the effect of tyramine and norepinephrine in isolated canine cerebral and mesenteric arteries.

- J. Pharmacol. Exp. Ther. 205:382-391,1978.
54. TRENDELEMBURG, U.: The supersensitivity caused by cocaine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 125:55-65, 1959.
55. TRENDELEMBURG, U.: Modification of the effect of tyramine by various agents and procedures. J. Pharmacol. Exp. Ther. 134:8-17,1961.
56. URQUILLA, P.R.; MARCO, E.J.; BALFAGON, G. and LLUCH, S.: Adrenergic mechanisms in cerebral blood vessels: effect of tyramine on the isolated middle cerebral artery of the goat. Stroke, 5:447-452,1974.
57. URQUILLA, P.R.; MARCO, E.J. and LLUCH, S.: Pharmacological receptors of the cerebral arteries of the goat. Blood Vessels. 12:53-67,1975.
58. WALHL, M. and KUSCHINSKY, W.: Autonomic receptors as studied in pial vessels-microapplication in situ. In: Neurogenic Control of the Brain Circulation. Proceedings of the International Symposium held in Stockholm, 1977. Edited by C. Owman and L. Edvinsson. Pergamon Press. Oxford.
59. WAKADE, A.R. and KRUSZ, J.: Effect of reserpine,

- phenoxybenzamine and cocaine on neuromuscular transmission in the vas deferens of the guinea pig. J. Pharmacol. Exp. Ther. 181:310-317, 1972.
60. WALTZ, A.G.; YAMAGUCHI, Y. and REGLI, F.: Regulatory responses of cerebral vasculature after sympathetic denervation. Am. J. Physiol. 221: 298-302, 1971.
61. WILLIS, T.: Cerebri anatome. Martin & Allestry, Londres, 1664.

